

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2000-505545
(P2000-505545A)

(43) 公表日 平成12年5月9日 (2000.5.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 27/26	3 3 1 Z
B 0 1 D 5/00		B 0 1 D 5/00	Z
	57/02		57/02
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 Q 1/24		C 1 2 Q 1/24	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 64 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平9-527896
(86) (22) 出願日 平成9年1月31日 (1997.1.31)
(85) 翻訳文提出日 平成10年7月31日 (1998.7.31)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 7 / 0 1 7 4 6
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 2 7 9 3 3
(87) 国際公開日 平成9年8月7日 (1997.8.7)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 1 0 , 9 0 4
(32) 優先日 平成8年1月31日 (1996.1.31)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 0 8 / 6 0 4 , 7 7 9
(32) 優先日 平成8年2月23日 (1996.2.23)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニヴァーシティ・オブ・テキサス・システム
アメリカ合衆国, 78701 テキサス, オー
スティン, ウェスト・セヴンス・ストリー
ト 201
(72) 発明者 ベッカー, フレデリック・エフ
アメリカ合衆国, 77024 テキサス, ヒュ
ーストン, ハンターズ・ブランチ 8
(72) 発明者 ガスコイン, ピーター・アール・シー
アメリカ合衆国, 77401 テキサス, ベレ
ール, ハイサシェ・ストリート 5313
(74) 代理人 弁理士 奥山 尚男 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 誘電電気泳動とフィールドフローフラクシオネーションを用いる分別方法と装置

(57) 【要約】

本願発明は、物質の分離、特徴付け、操作のための新規装置と新規方法とに関するものである。特に、本発明は、そのような物質を識別及び分離するために、粒状物質および溶解物質の周波数依存性の誘電および導電特性と、懸濁輸送培地の特性の使用を組み合わせている。本装置は、細胞を導入し、取り出すための、少なくとも一の電極素子と少なくとも一の入口ポートと出口ポートとを備えた室を含む。流体の流れにより室を通して運ばれた物質は、その後、エネルギーを与えられた電極により引き起こされる誘電電気泳動 (DEP) 力によって流体内で分離される。流体の中での分離に続いて、物質は、速度プロフィールに応じた速度で室を通して移動する。物質が室を通して通過した後、物質は特徴的な位置で室の反対側の端から出ていく。本発明の方法は、調査、状態の診断、治療目的で物質を識別及び分離するための装置を使用することを含む。そのような方法の例は、癌細胞の正常細胞からの分離、正常赤血球からの寄生された赤血球の分離、核酸の分離などといった、細胞混合物の分離を含む。

【特許請求の範囲】

1. a) 少なくとも一の入口と一の出口ポートとを備えた室を含み、該室が内部表面と外部表面とを備え、速度プロファイルに従う異なった速度で該室内を流れる流体の流れを生じるような構造的特徴を該室が持ち、

b) 該室の一部に沿って配設した少なくとも一の電極素子を含み、さらに、

c) 電気シグナル発生器により供給される少なくとも一の電気シグナルによって励起された上記少なくとも一の電極素子が空間的に不均一な電場を形成し、これによって上記室内の上記流体の流れの方向に直角な成分を持つ物質に誘電電気泳動力を生じさせ、上記流体内における上記物質の位置を変位させるようにした、誘電電気泳動とフィールドフローフラクショネーションを用いる分別装置。

2. 上記少なくとも一の入口と一の出口ポートとが異なったポートである請求項1の装置。

3. 上記少なくとも一の出口ポートが垂直方向において上記少なくとも一の入口ポートよりも低く、これによって上記物質の沈降による識別を可能とした請求項2の装置。

4. 上記少なくとも一の出口ポートが複数の出口ポートを含む請求項1の装置。

5. 上記室内の上記流体の流れに直角な方向にのみ上記誘電電気泳動力が働くようにした請求項1の装置。

6. 上記速度プロファイルに従う速度で上記室内を流れる上記物質の流れを上記流体内における上記物質の上記位置によって生じるようにした請求項1の装置。

7. 上記速度プロファイル内におけるその変位に比例した時間間隔で上記変位させられた物質が上記少なくとも一つの出口ポートから存在する請求項1の装置。

8. 上記速度プロファイルが流体力学的流体プロファイルである請求項1の装置。

9. 流体力学的流体プロファイルが放物線状流れプロファイルである請求項8

の装置。

10. 上記誘電電気泳動が従来の誘電電気泳動である請求項1の装置。
11. 上記室がチューブを含む請求項1の装置。
12. 上記少なくとも一の電極素子が上記チューブの内部表面に適合している請求項11の装置。
13. 上記少なくとも一の電極素子が上記チューブの外部表面に適合している請求項11の装置。
14. 室が上部壁、底部壁及び二つの側壁を含む請求項1の装置。
15. 上記物質が微粒子物質を含む請求項1の装置。
16. 微粒子物質が細胞、細胞塊、核酸、細菌、原生動物、又はウイルスを含む請求項15の装置。
17. 上記物質が可溶化物質を含む請求項1の装置。
18. 可溶化物質が分子、分子塊、分子混合物を含む請求項17の装置。
19. 分子又は分子塊がタンパク質又はタンパク質混合物を含む請求項18の装置。
20. 少なくとも一の電極素子が上記室の一部に沿って実質的に長手方向に適合している請求項1の装置。
21. 少なくとも一の電極素子が上記室の一部に沿って実質的に横手方向に適合している請求項1の装置。
22. 少なくとも一の電極素子が上記室の内部表面に適合している請求項1の装置。
23. 少なくとも一の電極素子が上記室の外部表面に適合している請求項1の装置。
24. 電極素子から電極素子までの幅方向の間隔の割合が上記物質の浮遊高さを変換するように調整されている請求項1の装置。
25. 上記少なくとも一の電極素子が上記室内の上記流体流れの方向に実質的に正規な平面に配置されている請求項1の装置。
26. 上記少なくとも一の電極素子が上記室内の上記流体流れの方向に実質的

に平行な平面に配置されている請求項1の装置。

27. 上記少なくとも一の出口ポートが少なくとも一のフラクシオンコレクターに接続されている請求項1の装置。

28. 上記少なくとも一の出口ポートが少なくとも一のフラクシオンウエルに接続されている請求項1の装置。

29. 上記少なくとも一の電極素子が複数の電極素子を含む請求項1の装置。

30. 個別に上記シグナル発生器に電氣的に接続した複数の電気伝導体の一つに上記各々の電極素子が各個に接続した請求項29の装置。

31. 上記複数の電極素子が電極列を含む請求項29の装置。

32. 電極列が上記室の上部壁に配置されている請求項31の装置。

33. 電極列が上記室の底部壁に配置されている請求項31の装置。

34. 上記複数の電極列が上記室の相対する表面に適合するようになっている請求項31の装置。

35. 上記速度プロフィールが実質的に平面である請求項1の装置。

36. 上記電気シグナル発生器が上記一の電気シグナルの強度又は周波数を変化させることができる請求項1の装置。

37. 上記複数の電極素子が異なった位相に励起される請求項29の装置。

38. 上記複数の励起された電極素子が流れ電場を形成する請求項37の装置。

39. 上記少なくとも一の入口ポートから横方向に変位した位置における少なくとも一の出口から上記変位した物質が存在する請求項37の装置。

40. 上記各々の電極素子が上記相対する表面の他の電極素子に直接相対さないように上記複数の電極列を配設してある請求項34の装置。

41. 上記電気シグナル発生器が位相変化可能である請求項1の装置。

42. 上記少なくとも一の電気シグナルが異なる位相の少なくとも三つのシグナルを含む請求項1の装置。

43. 誘電気泳動およびフィールドフローフラクシオネーションを利用する物質の識別方法において、

a) 室が内表面および外表面を有し、さらに該室は担体培地がこの室を通り抜けて、速度プロファイルに従って異なる速度で移動できるような構造上の特性を有し、かつ該室の一部には少なくとも一個の電極素子を取り付けられている、少なくとも入口一個および出口一個を有する室を得るステップと、

b) 該担体培地の取り入れにより速度プロファイルに従って該室を移動させるように、少なくとも一個の該入口に該物質を含む該担体培地を取り入れるステップと、

c) 少なくとも一個の電極素子がエネルギーを持つことで空間的に均質でない交流電界が創出され、それによって誘電気泳動力が該室においての担体培地の移動方向に対する法線成分をもって該物質に働くように、該少なくとも一個の電極素子に電気シグナル発生器によって少なくとも一の電気シグナルが供給されるステップと、

d) 該担体培地内のその位置によって該物質が識別されるように、該物質が該担体培地内の位置に変位されるステップと、
を含む物質の識別方法。

44. 上記電気シグナル発生器が大きさ又は振動数を変動可能である請求項43記載の方法。

45. 上記物質が上記速度プロファイルに従って識別される請求項43記載の方法。

46. 上記速度プロファイル内での上記変位となるように、整合する時間の間隔で少なくとも1つの上記出口から物質を追い出す請求項43記載の方法。

47. 側面に位置する少なくとも一個の上記入口からの置換により、少なくとも1つの上記出口から物質を追い出す請求項43記載の方法。

48. 上記物質を沈澱効果によってさらに識別する請求項43記載の方法。

49. 上記速度プロファイルに対する法線方向で上記物質に作用するような吸引力が働く請求項43記載の方法。

50. 上記少なくとも一の電気シグナルが少なくとも二の異なるシグナルであり、かつ、それによって上記物質が平衡状態に変位される請求項43記載の方法

。

5 1. 上記少なくとも2個の異なるシグナル間で、上記平衡状態が相乗相互作用によって決定されている請求項5 0記載の方法。

5 2. 上記物質が微粒子物質である請求項4 3記載の方法。

5 3. 上記微粒子物質が、細胞、細胞群、細胞組織、核酸、細菌、原生動物又はウイルスを含むものである請求項5 2記載の方法。

5 4. 上記微粒子物質が、複数細胞種の混合物を含むものである請求項5 2記載の方法。

5 5. 上記複数細胞種の混合物が、母親の血液の混合物に胎児の有核赤血球が存在するものである請求項5 4記載の方法。

5 6. 上記複数細胞種の混合物が、感染されていない赤血球の混合物にマラリア寄生体が感染した赤血球が存在するものである請求項5 4記載の方法。

5 7. 上記複数細胞種の混合物が、癌細胞の集合である請求項5 4記載の方法

。

5 8. 上記複数細胞種の混合物が、複数の赤血球および乳癌細胞の混合物である請求項5 4記載の方法。

5 9. 上記物質が溶解した物質である請求項4 3記載の方法。

6 0. 上記溶解した物質が、分子又は分子群を含むものである請求項5 9記載の方法。

6 1. 上記分子又は分子群がタンパク質である請求項6 0記載の方法。

6 2. さらに、上記物質の変位の変化が生じて、上記担体培地内のその位置によって該物質が識別されるように、さらに加えて、上記少なくとも一の電気シグナルを変動させるステップを含んでなる請求項4 3記載の方法。

6 3. 上記識別方法が、バッチ方式からなる請求項4 3記載の方法。

6 4. 上記識別方法が、連続方式からなる請求項4 3記載の方法。

6 5. 上記少なくとも一個の電極素子が、複数の電極素子を含んでなる請求項4 3記載の方法。

6 6. 上記複数の電極素子が、異なる位相で励起される請求項6 5記載の方法

。

67. 上記励起された複数の電極素子が、移動電界を創出する請求項66記載の方法。

68. 上記少なくとも一の電気シグナルが、異なる位相で供給される少なくとも三の電気シグナルを含む請求項43記載の方法。

69. 誘電気泳動およびフィールドフローフラクショネーションを利用する物質の識別方法において、

a) 室が内表面および外表面を有し、さらに該室は担体培地がこの室を通り抜けて、速度プロファイルに従って異なる速度で移動できるような構造上の特性を有し、該室の一部には少なくとも一個の電極素子を取り付けられおり、かつ、該室を通る移動流体を運ぶためにように該室内に少なくとも一個のダクトを有する、少なくとも入口一個および出口一個を有する室を得るステップと、

b) 該少なくとも一個の入口に該物質を取り入れるステップと、

c) 該室を速度プロファイルに従って移動させるように、少なくとも一の該ダクトに該物質を含む流体流出を取り入れるステップと、

d) 少なくとも一個の電極素子がエネルギーを持つことで空間的に均質でない交流電界が創出され、それによって誘電気泳動力が上記流体流出の方向に対する

法線成分をもって該物質に働くように、該少なくとも一の電極素子に電気シグナル発生器によって少なくとも一の電気シグナルが供給されるステップと、

e) 該移動流体内のその位置によって該物質が識別されるように、該物質が該流体流出内の位置に変位されるステップと、
を含む物質の識別方法。

70. 上記物質が上記速度プロファイルに従って分離される請求項69記載の方法。

71. さらに加えて、上記速度プロファイル内での上記変位となるように、整合する時間の間隔で少なくとも一個の上記出口から物質を追い出すステップを含む請求項69記載の方法。

72. 上記空間的に均質でない交流電界が、上記少なくとも一個の電極素子に

引き寄せられて上記物質に作用する請求項69記載の方法。

73. さらに加えて、上記少なくとも一個の電極素子に非常に接近して該物質を捕獲するステップを含む請求項72記載の方法。

74. 上記空間的に均質でない交流電界が、上記少なくとも一個の電極素子から押し返されて上記物質に作用する請求項69記載の方法。

75. 上記物質が、必要物質および必要でない物質の双方を含んでいる請求項69記載の方法。

76. 上記必要でない物質が上記少なくとも一の電極素子に非常に接近して該物質を捕獲され、上記必要物質が上記流体流出によって分離される請求項75記載の方法。

77. さらに加えて、上記必要でない物質が上記少なくとも一の電極素子に非常に接近して該物質を捕獲され、上記必要物質が流体流出によって分離されるように、少なくとも一の電気シグナルを変化させるステップを含む請求項76記載の方法。

78. 上記必要物質が上記少なくとも一個の電極素子に非常に接近して該物質を捕獲され、上記必要でない物質が上記流体流出によって分離される請求項75記載の方法。

79. さらに加えて、上記必要物質が上記少なくとも一個の電極素子に非常に接近して該物質を捕獲され、上記必要でない物質が流体流出によって分離されるように、少なくとも一の電気シグナルを変化させるステップを含む請求項78記載の方法。

80. 上記少なくとも一個の電極素子が、複数の電極素子を含んでなる請求項69記載の方法。

81. 上記複数の電極素子が、異なる位相でもって励起されている請求項80記載の方法。

82. 上記励起された複数の電極素子が、移動電界を創出する請求項81記載の方法。

83. 上記少なくとも一の電気シグナルが、異なる位相で与えられる少なくと

も3の電気シグナルを含む請求項69記載の方法。

84. a) 少なくとも一の入口ポートと一の出口ポートとを備えた室を得るステップと、ここで、該室は内側表面と外側表面とを備え、該室は担体培地を該室を通して移動させ、速度プロフィールに応じて異なる速度で移動する構造的特徴をさらに有し、少なくとも一の電極素子は該室の一部に沿って配設され、

b) 未知物質を含む該担体培地を該少なくとも一の入口ポートに導入し、該速度プロフィールに応じて、該室を通して該担体培地を移動させるステップと、

c) 電気シグナル発生器により与えられる初期周波数を有する少なくとも一の電気シグナルを、該少なくとも一の電極素子に印加するステップと、ここで、該エネルギーを与えられた少なくとも一の電極素子は、空間的に不均質な電界を生じ、それにより、該室を移動している該担体培地の方向と直角の成分を有する該

物質上に誘電電気泳動力を起し、

d) 保持周波数で該未知物質が該少なくとも一の電極素子に極めて近接して保持されるまで、該初期周波数を変えるステップと、

e) 該保持周波数から該周波数を変化させて、該未知物質が該少なくとも一の電極素子に極めて近接したところから放出され、該担体培地中の位置を置き換えられ、該担体培地の流れ中で、その位置に応じて該既知物質を区分するステップと

f) 該出口ポートで該未知物質を集めるステップと

g) 該未知物質の特徴付を行い、該未知物質を同定するステップと
を含んでなる誘電電気泳動フィールドフローフラクショネーションを用いて未知の物質の特性を決定する方法。

85. 該未知物質が、該速度プロフィールに応じて区分される請求項84に記載の方法。

86. 該少なくとも一の電極素子が、複数の電極素子を含む方法であって、該方法は、異なる相において初期周波数を有する該少なくとも一の電気シグナルを印加するステップをさらに含み、ここで、該エネルギーを与えられた複数の電極素子が、移動している電界を生じることの特徴とする請求項84に記載の方法。

87. a) 少なくとも一の入口ポートと一の出口ポートとを備えた室を得るステップと、ここで、該室は内側表面と外側表面とを備え、該室は担体培地が該室を通過して移動し、速度プロファイルに応じて異なる速度で移動する構造的特徴をさらに有し、少なくとも一の電極素子は該室の一部に沿って配設され、

b) 未同定物質を含む該担体培地を該少なくとも一の入口ポートに導入し、該速度プロファイルに応じて、該室を通過して該担体培地を移動させるステップと、

c) 電気シグナル発生器により与えられる初期周波数を有する少なくとも一の電気シグナルを、既知の方法の保持周波数で該少なくとも一の電極素子に印加す

るステップと、ここで、該エネルギーを与えられた少なくとも一の電極素子は、空間的に不均質な電界を生じ、それにより、該室における該担体培地の移動方向と直角の成分を有する該物質上で誘電電気泳動力を起し、

d) 該未同定物質が極めて近接して該少なくとも一の電極素子に保持されているかどうかを決定し、患者の状態を示すステップと、を含む、誘電電気泳動とフィールドフローフラクショネーションとを用いて、患者の試料内の未同定物質の存在を決定することによる状態を診断する方法。

88. 該少なくとも一の電極素子が、複数の電極素子を含む方法であって、該方法は、異なる相において初期周波数を有する該少なくとも一の電気シグナルを印加するステップをさらに含み、ここで、該エネルギーを与えられた複数の電極素子が、移動している電界を生じることの特徴とする請求項87に記載の方法。

89. a) 少なくとも一の入口ポートと一の出口ポートとを備えた室を得るステップと、ここで、該室は内側表面と外側表面とを備え、該室は、該室を通過して輸送流体を移動させ、速度プロファイルに応じて異なる速度で移動する構造的特徴をさらに有し、少なくとも一の電極素子は該室の一部に沿って配設され、該少なくとも一のダクトが室の中に入り、室を通過して該輸送流体を運び、

b) 同定された物質を含む患者の試料を、該少なくとも一の入口ポートに導入するステップと、

c) 輸送流体を少なくとも一のダクトに導入して、該室内の該速度プロファイルに応じた流速で流体の流れを起こすステップと、

d) 該同定された物質の保持周波数で電気シグナル発生器により与えられる少なくとも一の電気シグナルを、該少なくとも一の電極素子に印加するステップと、ここで、該エネルギーを与えられた少なくとも一の電極素子は、空間的に不均質な電界を生じ、それにより、該室を移動している該担体培地の方向と直角の成分を有する該同定された物質上で誘電電気泳動力を起し、

e) 該少なくとも一の電極素子に極めて近接した該同定された物質を保持するステップと、

f) 該速度プロフィールに応じた速度で、該同定された物質を含まない該試料を、輸送流体により移動するステップと、

g) 該出口ポートで該同定された物質を含まない試料を集めるステップとを含む、誘電電気泳動とフィールドフローフラクションを用いた同定された物質の存在を示された患者における状態を治療する方法。

90. 該同定された物質を該少なくとも一の出口ポートで集めるステップをさらに含む請求項89に記載の方法。

91. 該少なくとも一の電極素子が、複数の電極素子を含む方法であって、該方法は、異なる相において初期周波数を有する該少なくとも一の電気シグナルを印加するステップをさらに含み、ここで、該エネルギーを与えられた複数の電極素子が、移動している電界を生じることとを特徴とする請求項87に記載の方法。

92. a) 少なくとも一の入口ポートと一の出口ポートとを備えた室を得るステップと、ここで、該室は内側表面と外側表面とを備え、該室を通して輸送流体を移動させ、速度プロフィールに応じて異なる速度で移動する構造的特徴をさらに有し、少なくとも一の電極素子は該室の一部に沿って配設され、該少なくとも一のダクトが室の中に入り、室を通して該輸送流体を運び、

b) 癌細胞と正常な細胞とを含む患者の試料をを該少なくとも一の入口ポートに導入するステップと、

c) 該少なくとも一のダクトに輸送流体を導入して、該室内の該速度プロフィールに応じて流体流れを起こすステップと、

d) 電気シグナル発生器により与えられる少なくとも一の電気シグナルを、該

少なくとも一の電極素子に印加するステップと、ここで、該エネルギーを与えられた少なくとも一の電極素子は、空間的に不均質な電界を生じ、それにより、該

流体流れの方向と直角の成分を有する該癌細胞と該正常細胞で誘電電気泳動力を起こし、それにより該癌細胞を正常細胞から変位させ、

e) ここで、該輸送流体内の該癌細胞と該正常細胞のそれぞれの位置に応じて、該癌細胞と該正常細胞は該室内を該異なる速度で移動し、該癌細胞と該正常細胞は、該癌細胞と該正常細胞のと該変位に対応した位置で、該少なくとも一の出口ポートにおいて該室から出ることを特徴とし、

を含んでなる誘電電気泳動とフィールドフローフラクションを用いた癌細胞と正常細胞を分離することによって、患者の癌の状態を治療する方法。

93. 該癌細胞と該正常細胞とが、該異なる速度に比例した時間で該少なくとも一の出口ポートを出ることを特徴とする請求項92に記載の方法。

94. 該癌細胞と該正常細胞とが、該流体流れ中の該癌細胞と該正常細胞の変位に比例した時間で該少なくとも一の出口ポートを出ることを特徴とする請求項92に記載の方法。

95. 該少なくとも一の電極素子が、複数の電極素子を含む方法であって、該方法は、異なる位相において初期周波数を有する該少なくとも一の電気シグナルを印加するステップをさらに含み、ここで、該エネルギーを与えられた複数の電極素子が、移動する電界を生じることを特徴とする請求項84に記載の方法。

96. a) 少なくとも一の入口ポートと一の出口ポートとを備えた室と、ここで、該室は内側表面と外側表面と上部壁と下部壁と2つの側壁とを備え、該室は流体が該室を通過して移動し、速度プロファイルに応じて異なる速度で移動する構造的特徴を有し、

b) 反対向きの少なくとも二つの該壁それぞれの部分に沿って配設された電極列と、ここで、該各電極列は少なくとも一の電気コンダクターと電氣的に接続して、

c) 室の中に入る少なくとも一のダクトと、ここで、該ダクトは該流体を導入

して、該室の入口ポートから該室の出口ポートへ該物質を運び、

d) 該少なくとも一の電気コンダクターと接続した電気シグナル発生器と、

e) ここで、該電気シグナル発生器により与えられた少なくとも一の電気シグナルによりエネルギーを与えられた該電極列は、該室に電界を生じ、それにより、該物質に誘電電気泳動力を起こすことを特徴とし、
を含んでなる、物質を識別するための装置。

97. 該入口ポートは該上部壁と密接な関係で配設されている請求項96に記載の装置。

98. 該電極列は、異なる位相をもってエネルギーを印加されている請求項96に記載の装置。

【発明の詳細な説明】**誘電電気泳動とフィールドフローフラクショネーション****を用いる分別方法と装置****技術分野**

本発明は一般に、分子の分離と粒子の識別の分野に関する。より詳しくは、電気、流体力学または重力の組み合わせを利用する微粒子物質の分別に関する。

背景技術

細胞集団を同定し、その特性を決定して、精製することは、多くの生物学的医学的応用の根幹であって、時として研究プロトコルの出発点や、現在および将来の臨床プロトコルの基礎をなしている。例えば、細胞を分離することによって、患者の癌に起因する転移細胞の除去が必要な進行性癌を骨髄の自家移植により治療するなどの救命法が可能となる(Fischer, 1993)。血液細胞間のシグナルの研究などの(Stout, 1993)(Cantrell et al., 1992)他の用途では、精製度の高い細胞集団があるので、なければ不可能な研究が可能となる。現在、細胞の分類のアプローチには、細胞密度の違い(Boyum, 1974)、免疫上の特定標的(Smeland et al., 1992)や、受容器リガンドと単離微粒子細胞との相互反応(Chess and Schlossman, 1976)を、特定の細胞を分離するために利用している。

これらの技術は適切でないことが多いので、新規の物性によって細胞を同定しこれを選択的に操作できる工夫が所望されている。交流電気動力学の原理を利用して、電気回転法(method of electrorotation: ROT)による哺乳動物細胞の誘電特性決定(Arnold and Zimmermann, 1992; Fuhr, 1985; Gascoyne et al., 1994; Hozel and Lamprecht, 1992; Wang et al., 1994)や、細胞の識別と分類(Hagedorn et al., 1992; Huan et al., 1993; Gascoyne et al., 1992; Huan et al., 1992)が行わ

れた。これらの技術においては、細胞に交流電界が印加されると、細胞は電氣的に分極する。この電界が均質でないと、細胞は横から誘電電気泳動(dielectrophoretic: DEP)力を受け、細胞固有の機能である周波数応答を経験する(Gascoyne et al., 1992)。さらに、これらの特性は、細胞の組成と組織や、細胞の形態と表現型を反映する特色に強く依存する。したがって、電気分極が異なっている細

胞は、均質ではない電界において異なる力を受ける(Becker et al.,1994;Becker et al.,1995)。印加された周波数の機能として誘電電気泳動による哺乳動物細胞の動きを分析すると、検査対象のキャパシタンスや表面コンダクタンスなど、細胞膜の生物物理パラメーターが可能となる。DEPは、効果的に生物物理特性を並進力に変換でき、この並進力の方向と大きさが細胞の特性を表すので、異なる特性を持つ粒子間である程度の分離が起こる。DEPは顕微鏡的スケールで細菌と赤血球との分離(Markx et al.,1994)、生きているイーストと死んでいるイーストの分離(Wang et al.,1993) および赤血球から赤白血病細胞(Huan et al.,1992) の分離に用いられてきたが、これら各種混合物中の細胞型における電気分極の違いは、多くの細胞分類用途で期待されていた違いよりも大きかった。

フィールドフローフラクショネーション(F F F) も、粒子の密度、大きさ、容積、拡散率、厚さや表面電荷によって、一般に物質を分離するのに用いられてきた。この技術は、例えば生物学的および非生物学的物質を含む、大きさが約1 nm～約100マイクロメートルの、異なるタイプの多くの物質を分離することが出来る。フィールドフローフラクショネーションは、流体を細いチャンネルに通す場合、流体の滞留時間が異なるところから分離が可能となる。F F F法はクロマトグラフィ、電気泳動と限外濾過を組み合わせ用い、流速が異なるようにするには作用場または勾配が必要である。このように流速が異なると、例えば直線あるいは放物線などの流れのプロフィールが創出される。作用場を流れに対して

直角に働かせると、この作用場が流れのプロフィール中において物質に異なる変位を与え、物質は異なる速度で移動する。作用場は沈殿、横断流、温度勾配、遠心力などを基礎としている。しかしながら、この技術には、細胞集団の純度が不十分である、作業速度が遅い、あるいは標的のスペクトラムが限られているなどの難点がある。

したがって、当業者等は、微粒子物質、特に生物物質を、分離対象物質の構造を物理的に変えることなく、高度の識別力により分離することを必要としている。

さらに、上記方法では、特性決定および所望の物質を異物や望まじからざる物質

から精製することを含み、該物質の鋭敏な操作を行えるものでなくてはならない。

発明の概要

本発明は、周波数依存性の誘電および導電特性と、懸濁輸送培地の特性とを組み合わせる用いることにより、当該技術に内在する上記の欠陥を矯正することを目的としている。本明細書で使用する「物質」なる語は、微粒子物質、可溶化物質、またはそれらの組み合わせを指す。本発明により異なる微粒子物質および可溶化物質を同定し、選択的に操作する新規の方法と新規の装置を提供する。DEP力または流体の流れ特性を変えることによって、これらの粒子を採集することができる。本発明をこのように使用して、微粒子物質および可溶化物質が識別分離される。本発明の装置と方法は、異なる種類の物質を同時に分離することが出来る。

本発明は異なる種類の微粒子物質および可溶化物質を識別する方法と装置を提供する。この識別は、例えば微粒子物質の分離、特性決定、分化、および操作を内容とする。本発明によれば、微粒子物質を懸濁液としてから装置に投入する。識別を行う装置は、薄い、密封された室となっている。粒子は、例えば粒子の密度、大きさ、誘電率、導電率、表面電荷、および／または表面構造の違いによって識別される。

本発明の方法は、ミネラル、結晶、コロイド、導電粒子、半導体粒子、絶縁性粒子や気泡などの無機物質を含む、微粒子物質の識別に使用することができる。本発明の方法は、細胞、細胞オルガネラ、細胞凝集体、核酸、細菌、原生動物やウイルスなどの生物物質の識別に使用することが出来る。微粒子物質はさらに例えば、母胎血の混合物中の胎児の核形成した赤血球、正常細胞と混合している乳癌細胞などの癌細胞、マラリア寄生虫に感染している赤血球といった、いくつかの細胞種の混合物であっても良い。さらに、本発明の方法は、分子、またはタンパクや核酸のような分子凝集体などの可溶化物質の識別にも使用することが出来る。

粒子のサイズは、どのようなサイズでも識別することが出来る。しかしながら

、本発明は一般に、 $\sim 10\text{ nm}$ から $\sim 1\text{ mm}$ までの粒子が实际的で、対象物は例えば化学分子や生物分子(タンパク、DNA、RNAを含む)、分子集合体、ウイルス、プラスミド、細菌、細胞や細胞凝集体、原生動物、胚、その他の小生物、ならびに非生物分子、その集合体、ミネラル、結晶、コロイド、導電性粒子、半導体粒子、絶縁性粒子、および気泡である。生きている細胞を使う生物用途では、リガンド、染色や他の手段で細胞を変える必要なしで、細胞を分離することが出来る。分離作業中あるいはその後も細胞は傷付けられたり、変えられることなく、生存することが出来る。非生物用途でも同様にを変えることは必要ではない。しかしながら、生物物質を変えて分離することが必要である場合にも本発明の装置と方法は好適である。

この装置には、例えば室(チャンバ)が含まれている。室には、少なくとも入口一個と出口一個、内表面と外表面がある。室はさらに、流体や気体が室を通り抜けるとき、速度プロファイルに従って異なる速度で移動するような構造的特徴を持たせるよう設計しても良い。室の形は矩形でもよく、例えば上部壁、底部壁と側壁2個からなっているても良い。一実施態様においては、上部壁と底部壁を側壁より遥かに大きくして薄い室を作り、一つの速度プロファイルを構成出来るよ

うにしている。他の実施態様においては、上部壁と底部壁を側壁より遥かに小さくして、ここでも薄い室を作り、一つの速度プロファイルを構成出来るようにしている。さらに、室の構造は、円、三角、矩形、ヘキサデカゴナル、その他のどの幾何学的形態でも良い。本発明は特定の幾何学的形態に限定されるものではない。本発明の室は、例えばガラス、高分子材料、プラスチック、クォーツ、被覆金属など、多くの異なる材料から作ることが出来る。

室(チャンバ)には、室の一部または全部に沿って、少なくとも一個の電極素子を取り付ける。これら一以上の電極素子は各々電気導線に電氣的に結合される。以下に述べる説明で「電極素子」あるいは「電極」なる語を使用する。本明細書において使用する「電極素子」なる語は、一定の電気シグナル電圧が印加されて流れている、導電性の高い材料で作られた構造物を指す。これらの語は以下の説明で言及されるすべての電極構成物を含むものと了解する。電圧、周波数、相

またはこれらの組み合わせを変えることが出来る電気シグナル発生器が、少なくとも一個の電気シグナルを電極素子に送る。本発明の電極素子は、例えば複数の電極素子からなる場合を含み、複数の電気導線に電氣的に結合され、電気導線は電気シグナル発生器に結合されている。

本発明の室には複数の電極素子からなる電極列 (electrode array) が含まれている。本明細書で言う「電極列」なる語は、電極各々の幾何学的関係の範囲が相互に良好に定められている一以上の電極の集合体を指す。この列は、平行列、互いにかみ合っている突起と溝の列 (interdigitated castellated array)、多項式列 (polynomial array) などからなる平面電極のいずれでも良い。さらに、この列は、嵌合列など、特定のサイズと形態を持つ微小電極からなる列であっても良い。電極列は室の内表面または外表面に沿って取り付けられる。代わりに、室の壁面をなす材料中に電極列を導入することも考えられる。一実施態様においては、電極列を多層にして、絶縁層の間に挿入している。このような電極列の製法は当業者に

知られていて、多層回路板の製法に類似している。さらに、本発明では複数の電極列を、例えば室の相対する表面の両方に配置する場合もある。しかしながら、複数の電極列を室の隣接する表面またはすべての表面に配置することも可能である。

電極素子は室の一部に沿って実質的に縦方向にも横方向にも取り付けることが出来る。本発明では、室に対して角度をつけて取り付けるなど、他の電極素子構成も考えている。また、室の表面に取り付けたり、あるいは取り付けないで、三次元型電極素子を使用することも可能である。例えば、当業者に知られているように、電極素子をシリコンウェファーから製造することが出来る。電極を室の外表面に取り付ける場合には、例えばマイクロウェーブトランスミッターを存在させるなどのエネルギーを室内に伝達する手段を考えておく。電極素子は、室内を通る流体の流れに実質的に直角あるいは平行な面に構成するが、本発明の利益を実現するためには異なる多くの面や角度で構成することも考慮に入れなくてはならない。

電気シグナル発生器から少なくとも一個の電気シグナルが与えられて、電極素子がエネルギーを持った場合、電極素子によって空間的に均質ではない交流電界が創出され、室内を通る流体に対して法線方向の成分を持つDEP力が微粒子物質や可溶化物質に働くようになる。このDEP力は電極素子の構成によって異なる方向から流体に働く従来のDEP力 (cDEP:conventional DEP) である場合もあるし、進行波DEP(twDEP:traveling wave DEP)として働く他のDEPである場合もある。cDEP力は典型的には電極素子の面に対して実質的に法線方向に働く。すなわち、DEP力が物質を実質的にこの面に近づけたり、この面から遠ざけたりする。一実施態様においては、DEP力は流体に対して法線方向のみに働いている。本明細書に言う「流体に対する法線方向」なる語は、室（チャンバ）内を通る流体の流れに対して実施的に対向することなく、且つ実質的に非線形な

方向を意味する。この方向は例えば、対向しない、垂直方向、横方向あるいは他の方向のことである。このDEP力の効果により、微粒子物質や可溶化物質は流体内の位置に移動する。この変位は電極素子に対するものであるか、あるいは室の壁などのその他の基準に対するものであっても良い。

交流電界の相を変えることによって、進行波DEP (twDEP) として知られている別のDEPが創出される。cDEPは電界空間の非均質性に依存して物質を電界の強い領域に近づけたり、これから遠ざけたりする。twDEPは印加された電界の相分布に依存して、相の値が上がる方向へ、又はその反対の方向へ、物質を移動させる。

電極素子の幅と電極素子の容積との比を変えることによって、微粒子物質や可溶化物質が浮遊する高さを変えることが出来る。すなわち、本明細書に言う「浮遊する」あるいは「浮遊する高さ」なる語は、電界を変えることによって物質が何れかの方向に電極素子に対する高さを変位することを意味する。特異的に、この比率を変えると創出された電界も変わってくる。このように電界の大きさや均質性が変わると、同じように物質の浮遊する高さも変わる。この浮遊は垂直方向に限らず、例えば、水平方向に変位する場合もある。

本発明においては、cDEP力は電界の大きさと空間の非均質性、さらに電界によ

って物質中に誘導された電気分極の同相（実）部分に依存している。「電気分極」なる語は、後記する、有名なクラウジウスーモソティ因子に関連している。この電界が誘導する電気分極は、物質と懸濁培地相互の誘電特性の違いに依存している。これら二つの特性は一緒にして、複合誘電率として知られている。cDEP力は物質を電界の力が高い領域に近づけたり、これから遠ざけたりしているが、典型的実施態様では電極の面に近づけたり、これから遠ざけたりしている。

rms値である E_{rms} を持つ電界の強さで表される時間平均従来型誘電電気泳動力は次の式で表される。

$$F(r) = 2\pi\epsilon_m r^3 \operatorname{Re}[f_{cm}] \nabla E_{rms}^2 \quad (1)$$

式中、 f_{cm} は有名なクラウジウスーモソティ因子で、 $f_{cm} [\epsilon_p^*, \epsilon_m^*] = [\epsilon_p^* - \epsilon_m^*] / [\epsilon_p^* + \epsilon_m^*]$ と定義される。この式中、 ϵ_p^* と ϵ_m^* は、それぞれ物質と懸濁培地の複合誘電率である。クラウジウスーモソティ因子に、例えば物質の表面電荷などの他の条件を加れば、印加された電界により誘導または変更された他の形態の電気分極や導電率を説明することが出来る。力の式において、 r は識別を所望する物質の半径、 $\operatorname{Re}[f_{cm}]$ は因子 f_{cm} の実部（同相成分）および ∇E_{rms}^2 は印加された電界の大きさの非均一性因子である。式（1）に見られるように、クラウジウスーモソティ因子の同相部分が零より大きい場合、物質は強い電界に近づこうとする傾向がある。クラウジウスーモソティ因子の同相部分が零より小さい場合、物質は弱い電界に近づこうとする傾向がある。

本発明の他の実施態様においては、電極列が少なくとも3セットの電極素子からなっている。本明細書に言う「セット」とは、幾何学的関係の範囲が相互に定められている個々の電極素子の群である。このように範囲が定められている幾何学的関係には、例えば三角、円、四角または円錐断面のような複雑な形態がある。電極素子セットは電磁気理論に基づいて設計しても良いことを理解すべきである。印加された電気シグナルであって、異なる相を持つもの少なくとも一個を、少なくとも3セットの電極素子に印加する。例えば、印加されたシグナル一個を

コンデンサーその他の時間遅延回路によって適当に遅延させて、少なくとも3セットの電極素子各々に相の異なるシグナルを与えるようにする。代わりに、異なる相関係を持つ異なるシグナルを電極素子に与えても良い。このようにすると、シグナルによって、空間の大きさが均質ではない電界分布が作られ、シグナルは相分布に従って空間を進行する。

異なる相を持つ少なくとも一個の電気シグナルを少なくとも3セットの電極素子に印加することにより、cDEP力の他に、進行波誘電電気泳動(twDEP)力が創出される。twDEP力は印加された電界の相分布（小さい相領域方向に向う空間移動を反映する）と、電界によって物質中に誘導された電気分極の異相部分（虚部）に依存している。twDEP力は物質を相の値が高くなる方向に近づけたり、あるいはこれから遠ざけたりする。twDEP力は典型的に電極素子の面に実質的に平行する方向に働く。twDEPの場合、時間平均進行波誘電電気泳動力は次の式で表される。

$$F(t) = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Im}(f_{cm}) (E_{x0}^2 \nabla \Phi_x + E_{y0}^2 \nabla \Phi_y + E_{z0}^2 \nabla \Phi_z) \quad (2)$$

式中、 $\text{Im}(f_{cm})$ は、因子 f_{cm} の虚部（異相成分）で、 $E^2 \nabla \Phi$ は相の非均一性因子（式中、 E_{x0} 、 E_{y0} および E_{z0} は直交座標フレームにおける電界成分各々の大きさであり、 Φ_x 、 Φ_y および Φ_z は電界成分各々の相である）。式（2）に見られるように、クラウジウスーモソテイ因子の異相部分が零より大きい場合、力は物質を電界成分が大きい領域に近づける。クラウジウスーモソテイ因子の異相部分が零より小さい場合、力は物質を電界成分が小さい領域に近づける。

本明細書では、cDEPとtwDEPとを組み合わせ、これを一般化誘電電気泳動(gDEP)と称する。したがって、一般化誘電電気泳動力は式（1）と式（2）とを組み合わせた次の式で表すことが出来る。

$$F(t) = 2\pi\epsilon_m r^3 \left(\text{Re}[f_{cm}] \nabla E_{rms}^2 + \text{Im}(f_{cm}) (E_{x0}^2 \nabla \Phi_x + E_{y0}^2 \nabla \Phi_y + E_{z0}^2 \nabla \Phi_z) \right) \quad (3)$$

したがって、これらの力の一つまたは両方から影響される物質は、室内を流れる流体中の異なる位置に変位する。cDEP力は同一の電界強さに起因するtwDEPの

4倍以上であることに注目されたい。cDEPとtwDEPとはgDEPの主たる成分で、cDEPとtwDEPを組み合わせた他のgDEPも本発明による装置内で物質に

働いていることを理解すべきである。

dDEP力の他に、twDEP力も用いている本発明の一実施態様においては、物質は二次元（時間と水平方向）に変位する。上記で説明したように、フィールドフローフラクショネーションと結びついているcDEPは、物質を流体の流れ中の異なる位置に変位させる。さらに、電極素子が室内の流体の流れに実質的に平行な一実施態様においては、物質のtwDEPは電極素子の面に実質的平行に働いて、流体の流れを実質的に横断する。したがって、物質は室内に入ってきた旧の細い流体の流れから逸れて室を横切る。この屈折の方向と大きさは、物質の誘電特性、すなわち電界によって誘発された物質の電気分極の大きさを示している。かくて、屈折した物質は室内を通り抜け、物質が入った入口から横方向に変位している位置から排出される。

このようにして、cDEPとtwDEPとの影響が結びついて、物質を時間的および水平面的に変位させる。変位成分各々は投入された物質の異なる特性を表し、異なる特性を持つ物質は各方向において異なる力成分を経験する。したがって、物質の分極の同相部分(実部)、その密度、表面構成、容積、および流体の誘電特性に依存して室内を移動する時間によって、物質の識別が達成される。その体積と、分極の異相部分(虚部)、流体の誘電特性に依存して物質のその入り口位置からの横方向の変位に応じて物質の識別を行うことができる。ある変位レベルで横方向の位置が異なっている物質を、別個に識別出来るように出口を設計しても良い。例えば、横方向の位置をいくつか選択して、そこから排出する物質の特性を測定する器具としてレーザーを使用することも出来る。

通常電気導線を使って一以上の電極素子セットをシグナル発生器に結合する。通常電気導線は電極と同じ製法で製造することが出来るし、あるいはリボン導線、メッキリボン、メッキプラスチックなどの一以上の導線集合体にすることも出来る。マイクロウェーブ集合体を使って、シグナル発生器からシグナルを電極素子

に伝達することも出来る。電極素子はすべて結合しておいて、発生器から同一のシグナルを受け取れるようにする。このような構成では接地用金属板の存在が必要であることを考えておかななくてはならない。より典型的には、列に沿って交互電極 (alternating electrodes) を結合しておいて、発生器からの異なるシグナルを受け取れるようにする。発生器は電圧、周波数や相を変えることが出来るもので、例えばHewlett Packard社のModel No. 8116Aのような関数発生器でも良い。本発明に望ましいシグナルは、約0から約15ボルトおよび約0.1kHzから約180MHzの範囲、好ましくは約0から約5ボルトまで、および約0.1kHzから約10MHzまでである。物質の識別は、例えば細胞懸濁培地の導電率に依存しているので、これらの周波数は典型例としてのみ掲げるものとする。さらに、所望される周波数は、識別対象物質の特性に依存している。また、識別は、例えば電極素子の形態、サイズ、および構成に依存している。典型的実施態様においては、曲がりくねったシグナルを用いているが、周期的あるいは非周期的のどの波形のシグナルであっても良い。

本発明の室は、少なくとも一個の入口と出口を持つ。これらの口は同一の口であっても良いし、これらとは異なる他の口を持つように室を作っても良い。出口は垂直的に、少なくとも一個の入口よりも低い位置に配置する。このように配すると、微粒子物質や可溶化物質が室内を移動するときに沈殿することが出来る。室内に少なくとも一個の入口と少なくとも一個の出口を設ける他に、流体を室内に流す投入ダクトを持っても良い。

本発明による室の出口は多くの形態を取ることが出来る。具体的には、出口は単一の出口であっても良いし、複数の出口であっても良いし、また出口の列を形成していても良い。出口は、例えば室の幅全体あるいはその一部に沿って配置されていても良い。出口は各種形態、各種とサイズの物質を受容できるように対応していなければならない。例えば、出口のサイズは、識別対象物質の約2倍の大

きさから、室の幅全体までのサイズがある。一実施態様においては、出口がテフロンチューブなどの、チューブ素子一以上から出来ている。チューブ素子を組み合せて、各チューブ素子からなる横断面を持つ出口を作っても良い。さらに、例

例えば出口と分離された物質を収集するために用いる画分収集器または収集ウェルに結合する。本明細書に言う「分別収集器」および「収集ウェル」には、識別された微粒子物質および可溶化物質を別個に保有する貯蔵収集用具を含む。本発明の装置に含める他の部品としては、血球計、レーザー、粒子計測器、および分光計などの測定または診断装置がある。

本発明の室を移動する流体内において変位された後、変位した物質は流体内の物質の変位と整合する時間に、単数の出口あるいは複数の出口から排出される。具体的に、流体内での変位レベルが異なる物質は異なる速度で移動する。したがって、変位された物質は、流体の流れ内の変位によって識別される。流体内での微粒子物質と可溶化物質の位置のため、物質は室の速度プロファイルに従う速度で室内を移動せざるを得なくなる。

この速度プロファイルは、例えば放物線状の流れプロファイルなどの流体力学の流体プロファイルである。速度プロファイルは、流体の流量および室の幅と厚みを知ることにより測定することが出来る。速度プロファイルは次の式により計算することが出来る。

$$\text{速度プロファイル} = (\text{流量}) / (\text{室の幅} \times \text{室の厚み}) \quad (4)$$

流体の流れの速度プロファイルを決定するパラメーターとしては(但し、以下には限定されない)、矩形の態様では対向する壁間の距離である、室の幅または厚み、例えば、室の対向する壁の配置が平行していないこと、あるいは好適な位置に閉鎖物または羽根が存在していることに起因する流体流路の収縮または拡張、室の壁表面の粗さ、電極素子その他の表面構造の構成物や矩形、円形、楔形、階段を設けてあるものなどの室の幾何学的形態を含む、流体の流れの深さを周期的

あるは非周期的に変える原因となる室の壁の構造的特徴を挙げることが出来る。

本発明による装置の他の実施態様においては、室の対向する壁に互いに相面する二つの電極列が取り付けられている。室は特定の方角に向いていて、電極の面が実質的に直立し、室の薄い側面は垂直に配置されている。しかしながら、電極の面は必ずしも直立している必要はなく、本発明では角度を変えて装置を取り付

けることもその範囲に含むことを理解されたい。シグナル発生器から異なる電気シグナル（周波数および大きさ）を相対する電極に印加して、粒子に異なる c D E P 力を経験させる。さらに、電極列では、電極一つおきに異なる電気シグナルを受け取らせて、非均質性の交流電界を作る。

この実施態様においては、例えば識別対象の微粒子物質を受け取る入口一個を取り付けてある。入口は、例えば室の一末端頂部の近傍に置かれている。この装置には、室を通り抜ける流体を投入する一以上のダクトを設けている。室の投入末端の実質的に幅全体に沿ってこのダクトが設けられていて、流体が室一面に実質的直線方向に流れるようになっている。本明細書で言う「室一面の流体」とは、流体または気体の実質的に均一の流量で室内に進入することを指す。室を通過後流体は反対側の末端から排出される。室の排出末端には、例えば一以上の出口が設けられているが、これは一以上の出口列としても良い。

異なる電気シグナル（周波数または大きさあるいはその両者）を側壁各々に置かれている電極素子に印加される。異なる電気シグナル間で相乗相互作用が起こり、均質ではない電界が創出される。この異なる電気シグナル間の相乗相互作用により、異なる物質は室の側壁から特徴的な異なる距離を置いて平衡状態を保つが、本明細書においてはこれを「平衡位置」と称す。したがって、平衡位置は粒子に対する cDEP 力によって作られるものである。付言すると、twDEP は平衡位置に衝撃を与える場合がある。この平衡位置は物質の誘電および導電特性、室の対向する壁の電極に印加される電界の大きさと周波数、流体密度、粘度、お

よび流量に依存する。物質の平衡位置は、室内で作用して物質を浮揚させる異なる電気シグナルの相乗作用に依存する。流体内部での異なる物質の速度は、流体の速度プロファイルによって制御される。この速度プロファイルは室の中心部で最大の比率を示し、側壁からの距離が小さくなるにつれてこの比率は比例的に減少する。この速度プロファイルのため、室の壁から異なる平衡距離を置いて平衡状態を保っていた物質が異なる速度で運ばれる、したがって室を通過するためには異なる量の時間を必要とする。

物質が室を通過する間に沈殿する距離は、その通過時間に依存する。これは物

質が室を通過する間重力が物質に働くからで、「沈殿効果」として知られている。したがって、物質が室を通過する時間に従って、異なる物質は異なる深さに沈殿する。粒子の沈殿もまた、例えばサイズ、質量および容積などの物質の特性に依存する。したがって、粒子が室全体の長さを移動するのに必要な時間は、流体流れプロファイルによって制御される。さらに、異なる電気シグナル間の相乗作用によって決定されて、粒子が流体流れプロファイル中に置かれることになる。異なる特性を持つ粒子は、入口に対して異なる高さで設けられている異なる出口を通過して室から排出される。識別は「バッチ方式」か「連続方式」の何れかで行われる。バッチ方式では、粒子のアリコートを注入して、粒子の通過時間と出口における排出の高さとに相対して回収される。連続方式では、粒子を一定の流れとして入口に投入し、異なる高さで現れる物質を連続的に回収する。

対向する表面に取り付けた相対する二つの電極列を持つ室のさらに他の実施態様も可能である。この設計では、電極列は対向する表面に沿って設けられていて、電極各々は流体が流れる方向に実質的に平行である。しかしながら、流体の流れに垂直その他の方向の電極によって所望のDEPを作ることにも可能である。異なる電気シグナル（周波数、大きさまたはその組み合わせ）をシグナル発生器から相面する電極に印加すると、粒子は異なるcDEPおよび／またはtwDEP力を経験

する。電界の非均質性の程度によって、cDEPは物質を電極の面に変位させたり、あるいはこれから変位させるように作用する。電極列によって作られた電界の非均質性によって、twDEP力は電極列に対して実質的に平行な面に作用する。

フィールドフローフラクショネーションと協働するcDEPは、電極列に対して特徴的な距離に物質を変位させる。この特徴的な距離は、物質の誘電および導電特性、室の対向する壁面上の電極に印加された電界の周波数と大きさ、および流体の密度、粘度と流量によるものである。電極列に対する、これらの特性による平衡位置で、物質は平衡状態を保つ。室内で確立されている速度プロファイルのため、異なる平衡位置の物質は異なる速度で移動し、したがって、室を通過するために異なる量の時間を必要とする。

さらに他の実施態様においては、電極列は室の対向する垂直壁面上に設けられ

ている。この実施態様では、電極列は室を通過する流体の流れに対して直角に位置する。DEP力による変位の他に、物質は室を通る際に沈殿し、物質が沈殿する距離は室を通過するに要する時間と物質の沈殿率に依存する。物質の沈殿距離は $twDEP$ によっても影響される。特異的に、電極列が室の側壁に存在するとき、 $twDEP$ は実質的に垂直方向に作用する。したがって、 $twDEP$ は物質に働く沈殿力に貢献したり、これを阻止したりする。

この実施態様においては、物質を一定の流れとして少なくとも一個の入口に投入し、異なる変位位置に現れる物質を出口で連続的に回収する連続方式で物質の識別を行う。この代わりに、「パルス方式」でこの実施態様を操作することも出来る。パルス方式では、物質のバッチを少なくとも一個の入口を持つ室に投入し、所定の時間量の間電気シグナルを印加する。その後シグナルを止めて、流体の流れの影響下室を通過するままに物質を放置しておいて、少なくとも一個の出口で回収する。その後別のバッチを注入して同様の工程を反復する。

さらに本発明の利益を達成するため、例えば流量、流体の密度、粘度、誘電率、

pHおよび担体流体の導電率を変えることにより、異なる垂直変異位置の担体流体の特性を変化させる。このようにして、新しい物質特性を識別用途に利用する。

本発明の方法と装置により、初めて粒子と懸濁培地の周波数依存性誘電および導電特性の使用を紹介する。誘電電気泳動力が大きく且つ強く粒子の特性に依存しているので、これら粒子分画の新基準によって粒子を感度良く操作することが可能となる。懸濁培地と印加電界条件を正しく選択することによって高度の識別をすることが出来る。

前報で報告されているフィールドフローフラクショネーション法では、粒子密度範囲が狭く生物サンプルが限られており、好適識別を行うためには複雑な遠心機と遠心分離法が要求される。cDEP親和力法では、分離対象の粒子の誘電特性の差を大きくして、選択した微粒子物質と可溶化物質を完全に固定する一方、流体の流れる力によって他の物質を除去しなければならない。生物細胞は電界の強さが高いと損傷するので、印加する最高cDEP力が実際上限定され、したがってcDEP

親和力法では流体の最高流量が限られることになる。このため細胞の分類速度が遅くなってしまう。さらに、従来技術のcDEP親和力法は誘電電気泳動力成分を用いて、一般には電極阻止上に粒子を固定している。本発明のcDEP/FFF法では、流体の流れに対して法線である方向にcDEP成分を用いている。

さらに、本発明では、流れプロファイルは粒子の分離識別の機能的なメカニズムになっていて、誘電電気泳動力（主として、流体の流れプロファイルに法線方向の力成分）は、流体の流れ中で粒子の高さを制御する主たる手段となっている。上記で説明したように、流体プロファイルは、装置のデザイン、流体の速度、密度などによって制御される。本発明はFFFと誘電電気泳動力とを併用することにより、粒子の容積および密度と、粒子の周波数依存性誘電および導電特性ならびに表面構成との相乗効果を利用することが出来る。本発明による装置の操作は、粒子懸濁培地の導電率と誘電率、流体の流量、粘度と密度、印加電界の強さ、

および印加周波数を含み且つこれらに限定されない実験条件を変えることによって制御することが出来る。分別操作条件の設定にこのように多くのパラメーターを用いているので、微粒子物質と可溶化物質を識別する機能が大きく向上している。本発明の方法では、装置の出口から現れる粒子は、例えば一以上の画分収集器によって収集する。さらに、必要または所望の場合には、中性塩緩衝液、組織培養基、スクロース溶液、溶菌緩衝液、溶媒、定着剤などの適当な溶液または培地を含有する収集壁面に粒子を移動させることも出来る。

例示実施態様において、ガラススライド二枚を室の壁面として用いて、矩形の室を作っている。これらの室壁面はスペーサーにより間隔を空けて、矩形デザインを創出している。スペーサーは、例えばガラス、テフロンなどの高分子材料、その他の好適材料から製造される。室のサイズと室壁面間の空間は識別対象の粒子のサイズに依存する。本発明の方法を実施するためには、装置に約100nmから約1mmまでの空間、哺乳動物の細胞の識別を目的とする装置では、より好ましくは約20ミクロンから約200ミクロンまでの空間を設ける。さらに、識別処理量を大きくするためには、より長い室が所望される。本発明の装置は、1秒当たり約

1000個から3百万個の速度で細胞を識別することが出来る。識別速度の決定要因は、例えば識別対象粒子の誘電特性、電極のデザイン、室の長さ、流体の流量、および電気シグナルの電圧が挙げられる。室の寸法は、投入物質のタイプ、特性、および所望または必要な識別度に適当な寸法を選択する。

他の実施態様においては、室の一以上の表面で電極列を支持している。電極列は、例えば電極素子を平行させた微小電極列であっても良い。一実施態様では電極素子は互いに約20ミクロン離れている。この装置には、約0.1ミクロンから約1000ミクロンまで、細胞物質の識別の場合好ましくは約1ミクロンから約100ミクロンまでの幅を持つ電極素子を収容することが出来る。さらに、電極素子の空間は、約0.1ミクロンから1000ミクロンまで、細胞識別の場合より好

ましくは約1ミクロンから約100ミクロンまでである。電極が平行しているデザインの場合、電極の幅と電極空間との比を変えると、誘電電気泳動の大きさが変わり、したがってデザインの粒子浮揚特性も変化する。電極素子は通常の電気導線に繋ぐ。この電気導線は、シグナル発生器から電極素子に電気シグナルを輸送する単一の電極バスであっても良い。この代わりに、同一または異なる電気シグナルを与える一以上のバスによって電気シグナルを印加知ても良い。一実施態様では、対向する二つの電極列の長縁に沿っている異なる電極バスに電極素子を繋いでいる。この構成では、電極素子是一个おきに異なる特性のシグナルを輸送することが出来る。本明細書に言う「一つおきの電極素子」としては、列中の一つおきの電極または他のそのような繰り返しの素子選択を挙げることが出来る。電極素子は当業者に良く知られている標準マイクロリトグラフを用いて製造することが出来る。例えば、電極列はイオンビームリトグラフ、イオンビームエッチング、レーザーアブレーション、プリンテイングまたは電着似によって製造することが出来る。列は、例えばクロムの10nmシード層上に構成した100nm金層からなっているても良い。

本発明の装置は、本発明の各種方法により使用することが出来る。例えば、誘電電気泳動とフィールドフローフラクネーションとを用いて、本発明の装置を微粒子物質と可溶化物質の識別に使用することが出来る。この方法には次のステッ

プが含まれている。まず、識別対象物質を含有する細胞懸濁液、組織培養基、スクロース溶液などの担体培地を室の一以上の入口に投入する。このように投入すると、担体培地は速度プロファイルに従って室内を移動する。電気シグナルを一つ置きに少なくとも一個、相の異なる一位上の電極素子に印加すると、室内に均質ではない空間を持つ進行波電界が形成される。本明細書に言う「相が異なる」とは、列内の隣接する電極素子が相の異なるシグナルを受け取ることを意味する。しかしながら、多くの電極素子が同じ相のシグナルを受け取っている。例えば、

四つの隣接電極が相各々が 0° 、 90° 、 180° および 270° であるシグナルを受け取る。続いて次の四個の隣接電極素子が同じ相関係を持つシグナルを受け取る。電極素子間のこのような多くの相関係を用いて、相が同じである電極素子の順序や数を変えている。

異なる相によって形成された電界によって、物質は室内から担体培地内の位置に変位する。このようにして担体培地内の位置によって物質が識別される。特異的には、担体培地の速度プロファイルによって、室内の異なる位置に所在する担体培地は異なる速度で移動する。物質の識別を向上させるため、電気シグナルを変える(周波数、大きさ、相またはその組み合わせ)。このような変化により進行交流電界が変化し、さらに電極素子に対する物質の変位も変化する。

本発明の他の方法は、次のステップに従い誘電電気泳動とフィルールドフロフラクシオネーションを用いて、微粒子物質と可溶化物質の識別を行うものである。まず、本発明により物質を室内の少なくとも一個の入口に投入する。次に、例えば組織培養基あるいは気体である輸送流体(transport fluid) 少なくとも一個のダクトに投入する。この室内における流体効果により、室内で速度プロファイルに従う速度で流体が室内を流れる。少なくとも一個の電気シグナルを相の異なる電極素子に印加する。これらの加圧された電極は室内で均質ではない空間を持つ進行波電界を形成する。電界によってDEP力が物質に働き、物質は輸送流体内の位置に変位する。この輸送流体は速度プロファイルに従っているため、物質は流体内の位置によって分割される。この物質は一以上の出口で回収すること

が出来る。さらに、輸送流体の速度プロファイル依存性の時間によって、物質を回収することも出来る。

物質をさらに正確に識別するステップがある。これらのステップとは次の通りである。まず、物質が電極素子に引き付けられる、あるいは反発される周波数と電圧の組み合わせを持つ単数または複数の電気シグナルを選択する。こうすること

によって物質は輸送流体内でより明確な変位を行うことが出来る。この電圧と周波数の組み合わせを用いることによって、物質を電極素子により近接させて保持することが出来る。

所望するまたは所望しない物質を引き付ける周波数を選択することも出来る。本明細書で言う所望の物質とは、将来の使用を目的として、識別して回収することを所望する物質である。例えば、癌細胞を含むサンプルから正常血液細胞を分離して、正常細胞を患者に戻すことを所望する場合がある。例えば、患者の血液や骨髄から癌細胞を識別して、癌細胞を含まない血液サンプルを患者に戻す場合もある。

上記のような物質の組み合わせの式別方法としては、次のものがある。所望しない物質を電極素子の極めて近傍に保持する周波数を選択し、所望する物質は流体の流れによって所望しない物質から分割する。この周波数は保持周波数として知られている。その後流体の流れは所望の物質を室の単数または複数の出口まで輸送し、其処で回収する。回収後、所望の物質は、例えば患者の血流または骨に戻すか、診断用に使用する。その後、室を清掃するため周波数を変えるか、あるいは電圧それ自体を切る。このことによって、所望されない物質は電極素子近傍から放出され、流体の流れによって分割される。その後所望されない物質は流体に乗って室を通過し、所望の場合は回収される。回収後所望されない物質は、例えば診断その他の目的に使用される。

他の実施態様においては、所望の物質を電極素子近傍に保持し、まず所望しない物質を流体の流れによって分割して、上記で説明したと同様にする。

本発明の装置と方法は、多くの異なる、有用な用途に使用することが出来る。例えば、物質サンプル中の未知の微粒子物質や未知の可溶化物質の特性を測定す

るために本発明の方法を使用する。そうして、これらの特性を既知の物質と比較する。さらに、本発明の方法を、患者のサンプル中に未確認微粒子物質や未確認

可溶化物質が存在している測定して、病状を診断するのに使用することが出来る。未確認物質は、例えば癌、ウイルス、寄生動物などの存在である。病気の存在を測定した後、本発明の方法により、本発明の装置を使って正常血液または骨髓細胞と癌、ウイルス、寄生動物などとを識別することによって病状を治療する。

本発明において使用される「操作」なる語は、例えば特性決定、分離、分画、濃縮および／または単離を含むものとする。特定の成生物とサービスに有用な器具を生物学的に使用する典型例としては、血液や造血幹細胞中の上皮腫瘍細胞や白血病細胞などの腫瘍細胞の操作、骨髓や造血幹細胞中の腫瘍細胞の浄化、他の正常細胞との混合、幹細胞中の残存Tリンパ球の浄化、腫瘍細胞や幹細胞などを含む特異的な標的細胞種の濃縮化を含むものとする。さらに、白血球細胞集団の操作、正常白血球中のマラリアに侵された白血球の除去と濃縮、および正常細胞中の他の病原菌に侵された細胞の除去、細胞周期の異なる相における細胞操作、生きているまたは死んでいる細胞の操作、単離細胞核の操作、遺伝子検査を含む将来の分析を目的とする母親の血液から採取した核形成させた胎児の赤血球の操作を含めるものとする。さらにまた、本発明は、水、血液、尿、細胞混合物、その他の懸濁液中の細菌、ウイルス、プラスミド、その他の原始生物の操作、Papスミアを含む生検および血小板および切屑検査による腫瘍細胞の操作確認、細胞混合物中の転移腫瘍細胞の操作確認も考慮に入れている。

電極の形態を変えて小型化すれば、分子量、folding characteristicsや誘電特性によるDNAまたはRNA分子および／またはDNAまたはRNAフラグメントの操作、染色体の操作、特異的タンパク／DNAおよびタンパク／RNA凝集体の操作、混合物中の各タンパクの操作、特異的に細胞以下の分子複合体および構造物の操作にもこの技術を使用することが出来る。

異なる用途において至適な粒子識別を達成するため、本発明は特に電極デザインおよび室デザインを標的範囲としている。これらのデザインによって、粒子特

性である粒子浮遊の高さについて感度の良い依存性を持つことが出来る。例えば、平行電極デザインにおいて、電極の幅と電極の空間との比を変えると、誘電電気泳動力の垂直成分が変わり、したがってこのデザインの粒子浮遊特性も変わる。また、粒子識別を向上させる別の戦略として、例えば印加周波数および／または電圧が異なる2セット以上の電極素子を用いて、電極列に印加される電気シグナル間の相乗効果を室の底部壁面と頂部壁面の両方に利用することが挙げられる。さらに、誘電（すなわち、非導電性）素子を室内に置いて、電界分布と流体の流体力学プロファイルの両方を変えることが出来る。電極素子のサイズと形態は至適識別が可能となるように設計する。さらに、数個の幾何形状を持つ電極（同じまたは異なる電気シグナルが加圧されている）を直列（serially）に連結して、異なる微粒子物質や可溶化物質間で段階的に識別することが出来る。複数の異なる室構成も系統的に使うことが出来る。最後に、上流のcDEP／FFFまたはgDEP／FFF構成物によって分離された細胞を、下流のcDEPまたはgDEPで回収保持して特性決定することも出来る。

図面の簡単な説明

次の図面は本発明の特定の態様をさらに説明するために、本明細書の一部として収載されたものである。本明細書の特定実施態様の詳細説明と共にこれら図面の一以上を参照すれば、本発明をより良く理解することが出来る。

図1Aは、本発明の装置のブロック図である。

図1Bは、流体の流れに対して法線である位置に電極列を配置した本発明の装置のブロック図である。

図1Cは、流体の流れに対して平行である位置に電極列を配置した本発明の装置のブロック図である。

図2Aは、物質を装置内に投入した際の典型的な軌道を説明する本発明の装置の側面図である。

図2Bは、物質を装置内に投入した際の典型的な軌道を説明する本発明の装置の上面図である。

図2Cは、図2Aの末端図である。

図3Aは、HL-60細胞が、フィールドフローフラクショネーションの影響を受けて時間を関数として本発明の装置から排出しているのを図示したものである。

図3Bは、HL-60細胞が、フィールドフローフラクショネーションの影響を受けて時間を関数として本発明の装置から排出されているのを図示したものである。

図3Cは、HL-60／ヒト全血細胞が、フィールドフローフラクショネーションの影響を受けて時間を関数として本発明の装置から排出されているのを図示したものである。

図4Aは、DS19細胞がcDEPの影響を受けて周波数を関数として浮遊している高さを図示し浮揚たものである。

図4Bは、DS19細胞がcDEPの影響を受けて周波数を関数として浮遊している高さを図示したものである。

図5Aは、HL-69細胞が連結cDEP／FFF力の影響を受けて周波数を関数として本発明の装置を移動している速度を図示したものである。

図5Bは、MDA468細胞が連結cDEP／FFF力の影響を受けて周波数を関数として本発明の装置を移動している速度を図示したものである。

図5Cは、MDA435細胞が連結cDEP／FFF力の影響を受けて周波数を関数として本発明の装置を移動している速度を図示したものである。

図5Dは、MDA435細胞が連結cDEP／FFF力の影響を受けて電圧を関数として本発明の装置を移動している速度を図示したものである。

実施態様の説明

下記の実施例は本発明を例示する実施態様を説明するために収載したものである。本発明を実施するに当たり、下記の実施例で開示されている装置と技術が良く機能するものであることを、本発明者らは見出し、したがってこれらは好適実施態様を構成するものであると考えられることを、当業者は理解できよう。しかしながら、当業者は、本開示に鑑み、開示されている特定の実施態様に多くの変更を加えることが可能であるが、これらの変更は本発明の精神と範囲から逸脱することなく、同様の結果が得られることを理解すべきである。また、下記実施例では粒子なる語を使用しているが、本発明の装置と方法は可溶化物質にも好適で

あることを当業者は認識することであろう。

実施例 1

図1Aは本発明の装置の典型的実施態様を示している。この図において、電極列5は室10の底部に配置されている。しかしながら、電極列は本発明に従って設けられる室の頂部および／または底部および／または側壁に配置することも考えている。図1Bで示すように、電極列5を室の壁面に沿い、且つ室10を通ずる流体の流れに対して法線である位置に配置しても良い、列は流体の流れに対してどのような角度でも配置することが出来る。例えば、平行でも良いし、また他のどんな角度でも良い。この実施態様では、室が薄い室となるように壁面を配置している。例えば、壁面と同じ材料、あるいはテフロンスペーサー、封止剤、その他誘電性や導電性材料から作られているスペーサー20によって、間隔を開けて壁面を離している。電極列に電気シグナルを印加すると、投入シグナルの周波数と大きさに依って変化する均質ではない交流電界が作られる。特定実施態様においては、電極素子5は図1Bで示すように、流体の流れ35に対して法線である位置に取り付けられている。電極バス (electrode bus) 40および45である電気導線が電極列5の素子一つおきに電気シグナルを印加する。電界の強さは印加電圧、室内の位置、および電極素子のサイズと空間に依存する。哺乳動物細胞の操作には、電界の強さは 1×10^6 V/mの単位でなければならない。しかし

ながら、油性培地に入れた物質の場合にはもっと強い電界を必要とする。識別対象物質を担体培地に入れて、室の少なくとも一個の入口15に投入した。入口は担体培地の投入が可能であるように一個以上が設けられている。担体培地の投入は、デジタルシリンジポンプ、手動注射器、蠕動ポンプ、重力カテーテルなどで行う。上記で説明したように、微粒子物質には、例えば生物分子や非生物分子を含有させても良い。また、微粒子物質に可溶化物質を含有させても良い。担体培地としては、例えばスクロースとデキストロースの混合物、組織培養基、非イオン性溶質または両性イオン溶質、その他の懸濁培地、あるいは非生物油、フェニールアルコール、 CCl_4 、エチレングリコールその他の当業者に知られている溶媒を含有する無細胞懸濁緩衝液からなる溶出液が挙げられる。この代わりに、一以上

のダクト25を設け、これに流体を投入して、室内10に流しても良い。

担体培地が室内を通して流れる際、流体が室頂部および底部の壁面から離れるにつれて流量が上昇して中心部で最大に達する、薄層流れプロファイルが形成される。しかしながら、室の形態を調整して、室中心部以外の場所で流量が最大となる流れプロファイルを形成することも出来る。典型実施態様においては、この流量は約0.1ml/min.から約100ml/min. まで、より好ましくは約1ml/min.から約100ml/min. までである。電極素子5に電界を印加すると、電極素子と担体培地の誘電および導電特性により、粒子に対する従来型誘電電気泳動力が形成される。

印加電界の周波数と強度を制御することにより、担体培地の方向に対して法線方向である誘電電気泳動力成分を制御して、電界を形成する電極素子5から特徴的な距離を置いて粒子を平衡状態に保持する。特定の実施態様においては、誘電電気泳動力は専ら垂直方向に働くため、粒子は室底部の壁面から浮遊した高さで平衡状態を保つ。このような力は垂直に設けられた室または空間で使用するのに好適な室に発生する。この誘電電気泳動力は、流体力学的な力と重力が連結し

た力の作用と協働して働いている。粒子各々に働いている誘電電気泳動力は印加周波数におけるその動電率と導電率ならびにその容量に依存しているので、異なる特性を持つ粒子は電界を形成する電極素子から異なる距離を置いて位置する。室底部の壁面からの高さが異なっている流体は異なる速度で流れるので、異なる物性を持つ粒子は異なる速度で室10を通過して、異なる時間を置いて出口30に現れる。室10から排出される微粒子物質を回収するため一以上の出口を設けても良いことを理解できよう。

図1Aの室10はcDEP力とフィールドフローフラクショネーションの他に、twDEP力も利用し、これにより物質を二次元変位（時間と水平面）させる。しかしながら、この実施態様では、図1Cに示すように、電極列は流体の流れに対して実質的に平行となる位置に置かれている。上記で説明したように、物質に働くcDEP力は物質を流体の流れ内の位置に変位させる。その上に、電極素子5に異なる相が印加されると、電極素子5の面に実質的に平行に作用し、流体流れまで実質的

に横に移動する、物質に働くtwDEPが発生する。したがって、物質は室10に入って来た時の元の細い流れから室10を横切って横方向に逸れてしまう。逸れた物質は室10を通り抜けて、入って来た時の入口15から横に変位した位置の出口30から排出される。このようにして、この実施態様においては、cDEPおよびtwDEP力が連結した影響に依って、物質が時間と水平面の両方で変位したのである。

実施例2

図2Aは本発明装置の第二実施態様を示している。この装置では、図2Bおよび図2Cで示すように、室10の対向する表面上に相面する二つの電極列5が設けられている。電極列5が実質的に垂直に直立できるように、室は回転されている。この実施態様においては、室の薄い側面が垂直に位置するように、室を配置している。しかしながら、電極の面は垂直のみである必要はなく、本発明では

角度を変えて装置を配置することを考慮している。シグナル発生器から異なる電気シグナル（周波数と大きさ）を相面する電極に印加すると、粒子は列5が形成する電界から異なるcDEPを経験する。さらに、相面する電極列5各々内では、シグナル発生器からの異なる電気シグナルにより、均質ではない交流電界が形成される。

この装置では、例えば、識別対象微粒子物質を受け取るための入口15を一個設けてある。入口15は室10の一末端の頂部近くに位置する。この装置には、室10を通り抜ける流体を投入する一以上のダクト25を設けても良い。室10の投入末端の実質的に全幅沿いにこのダクト25を置いて、室10全面を実質的に直線方向に流れる流体を導入させる。

導入された流体は微粒子物質を担持して、室10を通過する。この流体としては、例えばデキストロースとスクロースとの混合物、組織培養基、非イオンまたは両性イオン（zwitterionic）溶液、その他の懸濁培地、あるいは非生物油、フェニール、アルコール、 CCl_4 、エチレングリコールその他の当業者に知られている溶媒を含有する無細胞懸濁緩衝液などの溶出液が挙げられる。室10を通過後流体は反対末端の出口30から排出される。この室10の出口末端は、図2Aに示すように、一以上の出口列を構成できる一以上の出口30からなっても良

い。

印加電界が存在しない場合、すなわち電気シグナルが電極素子5に印加されていない時には、粒子は流体の流れの影響に依って室10内を移動する。この流体は異なる速度で流れるように制御することが出来る。さらに、室10の幾何学的デザインにより、例えば、最も速い速度で室10の中心部に流れることが出来る薄層流れが形成される。即ち、水平面に沿って流体力学的流れプロファイルが出来るのである。流体の流れの影響と同時に、粒子に重力が働いて粒子が沈殿し、その沈殿率によって決定される特徴的な高さで室10を通過する。

しかしながら、電気シグナルが印加されると、粒子はcDEPのため、電極列5が配置されている室10の側壁から離れた、平衡位置として知られている特徴的な距離に移動する。この実施態様では、異なる電気シグナル（周波数または大きさまたはその両方）側壁各々の電極素子5に印加される。均質ではない電界を形成し、粒子にDEP力を働かせる異なる電気シグナルの相乗効果により、異なる粒子は室の側壁から離れた異なる特徴的な距離で平衡状態を保っている。異なるシグナルが形成する電界によるDEP力の相乗効果に依って、粒子は室の側壁から離れた異なる特徴的な距離で平衡状態を保つのである。

このような粒子の平衡状態は、図2Bに示すとおり、粒子の誘電および導電特性、対向する室の壁面上の電極に印加される電界の大きさと周波数、ならびに流体の密度、粘度と流量に依存する。室10に投入された物質は、電極列5から離れている異なる位置で移動する。薄い室を流れ抜ける流体によって速度プロファイルが確立するので、室の壁面から離れた距離で平衡状態を保っていた粒子は異なる速度で運ばれるため、室を横断するためには異なる量の時間を必要とする。流体が流れる速度は室の中心部に向かう時に最大となり、側壁に近づくに連れて比例的に低下する。流体の流量は、約0.1ml/min. から約1000ml/min. まで、より好ましくは、約1ml/min. から約100ml/min. までである。

しかしながら、当業者は装置の寸法が変わると流体の流量に影響すること、および上記の流量はこの装置の寸法に対して示したものであることを認識するであろう。

粒子が室を通過する間中重力が働くので、室を通過中に粒子が沈殿する距離は通過時間に依存している。したがって、粒子が室10を通過する時間に依って、異なる粒子は異なる深さに沈殿する。粒子の沈殿はさらに、例えば、粒子のサイズ、質量、および容積などの特性に依存している。したがって、粒子が室の全長を流れ抜けるのに必要な時間は、流体の流れプロファイルによって制御される。

そうして、粒子は異なる電気シグナルの相乗効果に決められて、流体の流れプロファイルに乗るのである。識別はバッチ方式か連続方式のいずれかで行われる。バッチ方式では、粒子のアリコートを入力し、粒子の通過時間と排出時の高さに対応して出口30で回収される。連続方式では、粒子を一定の流れにして入口に注入し、異なる高さで現れる粒子を連続的に回収する。

本発明の装置では、異なる高さにおける担体培地の流量ばかりでなく、流体の密度、誘電率、pH、および導電率などの特性も変えることができる。このようにして、粒子の新たな特性を特定の分離用途に利用することが出来る。

一般事例においては、器具を何れかの角度で特定の方向に向かせて、上記で説明した水平事例と垂直事例の識別態様を活用することが出来る。このような一般的状況では、cDEP力のすべての要素と共に、粒子の密度、沈殿率や誘電特性を利用する。連続方式またはバッチ方式の分離も可能である。本発明の装置の異なる実施態様では、出口30に連結する新しい要素を用いている。例えば、本発明の装置の出口30に現れる粒子を一以上の画分収集器などで回収している。さらにその上、例えば血球計算器などの測定または特性決定用機械によって物質を測定している。さらに、必要な場合、中性塩緩衝液、組織培養基、スクロース溶液、溶菌緩衝液、溶媒、定着剤などの適当な溶液や培地を含有する回収ウェルに粒子を移して、室から排出される細胞を捕捉している。

この第二の実施態様の方法では、電極列5が形成する連結電界から実質的に垂直方向に作用するtwDEPを利用している。シグナル発生器から相面する電極5に異なる電気シグナル（周波数、大きさ、および相またはその組み合わせ）を印加すると、粒子は異なるcDEPおよび／またはtwDEP力を経験する。cDEP力は電極の面に物質を引き寄せたり、あるいはこれから遠ざけたりして、流体の流れ中の平衡

位置で平衡状態を保つようにする。物質は室10を流れる間に沈殿する。物質が移動の間に沈殿する距離は、室10を通過するのに必要な時間と物質

の沈殿率に依存している。

この方法では、物質の沈殿距離はtwDEP力によっても影響される。電極列5が室10の側壁に所在し、流体の流れに対して平行に位置する時、特異的にtwDEP力は実質的に垂直方向に作用する。したがって、twDEP力の要素は物質に働く沈殿力に貢献するか、あるいはこれを阻止する。このようにして、物質が室10通過時に経験する純変位量が変化する。

この方法による識別は、物質を一定の流れにして入口に注入し、異なる変異位置で現れてくる物質を出口で連続的に回収する連続方式で実施することも出来る。この実施態様をパルス方式で操作することも可能である。識別の利益をさらに向上するために、担体流体の流量、流体密度、粘度、誘電率、pH、および導電率を変えることにより、担体流体の特性を変えることが出来る。このようにして、担体流体の新しい特性を特定の識別用途に利用する。

操作方法

下記により本発明の装置と方法の構成を詳細に説明する。

一実施態様においてガラススライド（例えば、1"x1.5"）二枚を室壁面として用い、本発明の装置を制作した。これらの壁面の間にテフロンスペーサーを置いて間隔を空けた。しかしながら、室の壁面を離す他の方法としては、糊、ポリマーガスケット、や精密機械締め具などによるものがある。壁面間の間隔は約0.1ミクロンから約1000ミクロン、より好ましくは約10ミクロンから約200ミクロンまでである。この装置を用いる研究では、間隔は127ミクロン出会った。室の一壁面には、相互に約20ミクロンの間隔を置く、幅約20ミクロンの平行電極素子からなる微小電極列を担持させた。電極素子は投入口から排出口までの室の全長に跨るように配置することも出来る。電極列の長さ、幅、厚みおよび間隔を変えることにより、強度も異なり、非均質度も異なる電界を形成することが出来る。

電極列は本発明で使用することが出来るが、接地板に接続していさえすれば、

単一の電極素子でも用途によっては十分である。さらに、電極列は平行でなくても良く、直列、リニア、polynomial、交互配置、三次元などの幾何学的構成も利用することが出来る。

典型実施態様において、電極素子をおき、室壁面の対向する二つの長縁に沿っている電極バス (electrode bus) に接続している。電極バスは電気シグナル発生器に接続するが、このシグナル発生器は、例えば関数発生器であっても良い。他の好適シグナル発生器としては、例えば、オシレーター、パルス発生器、デジタルアウトプットカード、RF源、メーザーなどが挙げられる。電極列は当業者に知られている標準マイクロリトグラフによって制作する。例えば、イオンビームリトグラフ、イオンビームエッチング、レーザーアブレーション、印刷または電着によって電極列を制作する。本章で説明している典型実施態様の電極列はクロムの10nmのシード層に積層した100nmの金である。本発明で使用するシグナルは約0から15Vまでで、且つ約0.1kHzから約180MHzまで、よりこのましくは約10kHzから約10MHzまでである。下記の実験では、HP 8116A関数発生器でシグナルを発生させている。本発明で使用する流体の流れは、約0.1ml/min.から約5001ml/min.まで、より好ましくは約1ml/min.から約501ml/min.までである。下記の実験では約1-100ml/min. の流体の流れをデジタルシリンジポンプで発生させている。

フィールドフローフラクショネーション

下記で説明する実験では、(健康なボランティアから静脈穿刺により採取して、5mMヘミソジウムEDTAを含有する Ca^{2+} / Mg^{2+} -freePBS 90部で希釈した)血液細胞を、標準条件で培養して、遠視分離により採取したHL-60白血病細胞と3:2の比率で混合した。この細胞混合物をデキストロース3mg/mlを含有する等張(8.5%)スクロースで二回洗い、最終濃度がこの同じ培地1ml当たり悪性細

胞は 2×10^7 、正常細胞は 3×10^7 となるように再懸濁した。さらに、ヘミソジウムEDTAを加えてその最終濃度が約0.7mMとなるようにして、懸濁液の導電率を10mS/mに調整した。本発明では他のサンプル採取加工方法も許容している。また、異なる混合比率による混合物も使用することが出来る。例えば、細胞混合物をス

クロース8.5%とデキストロース0.3%の等張溶液で二回洗い、最終濃度がこの同じ培地1ml当たり悪性細胞は 1×10^7 、正常細胞は 3×10^7 となるように再懸濁し、最終濃度約0.7mMのヘミソジウムEDTAで導電率を10mS/mに調整する。

図3Aは、HL-60細胞(ATCC)をRPMI 1640 10% FBS 22mM HEPES 培地で培養し、上記で説明した装置でこの細胞のフィールドフローフラクショネーションを行った結果を示している。流量200ml/min.で画分開始された。図3Aに示すように、細胞流出開始後約10分で装置から排出されるHL-60細胞が急増した。この急増後細胞数は急速に低下し、其の俟約50分続いた。図3Bは流量100ul/min.で同様にして行ったHL-60細胞のフィールドフローフラクショネーションの結果を示している。図3Bに示すように、細胞流出開始後約30分で室から排出されるHL-60細胞が急増した。このばあいでも、急増後細胞数は急速に低下し、そのまま約50分続いた。

図3Cは、HL-60細胞とヒト全血の混合物をスクロース8.5%とデキストロース3mg/mlの培地で培養し、mS/mlを調整しものを、上記で説明した装置でこの細胞のフィールドフローフラクショネーションを行った結果を示している。流量100ml/min.で画分開始された。図3Cに示すように、流出開始後約20分で室から排出されるHL-60細胞が急増した。その後約60分で第二の細胞数増加が起こったが、これはヒト血液細胞の排出と関連していた。しかしながら、細胞の排出はピークの前後を通じて継続していたことが認められる。したがって、フィールドフローフラクショネーションによる分離では、完全な分離を行うこと

は出来ない。図3A,3Bおよび3Cは、フィールドフローフラクショネーションは異なる特性を持つ粒子を一部識別分離することは出来るけれども、より優れた識別機能が必要であることを示している。

本発明の装置を用いて微粒子物質に対するcDEP力を発生させる三種の実験を実施した。

(1) cDEP力による細胞の浮遊

導電率56mS/mのスクロース8.5%とデキストロース0.3%の溶液中に保持されたDS-19ネズミ赤白血病細胞(M. Rifkind)の浮遊を、流体の流れの不存在下、

周波数および電極に印加したシグナルの電圧を関数として検討した。導電率が約 $10\text{mS}/\text{m}$ から約 $2\text{S}/\text{m}$ までの範囲である、組織培養基などの各種溶液も使用できることを理解すべきである。さらに、細胞のみの集団も利用可能である。溶液の導電率が細胞内部よりも遥かに高い、あるいは遥かに低い何れかの場合、これらの溶液は実施可能である。この実験結果を図4Aと図4Bに示す。周波数範囲 $1\text{kHz}\sim 40\text{kHz}$ で、印加電圧の範囲がピークからピークへの大きさを 4V ($4\text{V peak to peak (p-p)}$) である場合、図4Aに示すように、DS19細胞は 12ミクロン 以上浮遊した。 40kHz 以上では、浮遊の高さは急速に低下し、周波数が 140kHz 以上に達すると、細胞は全く浮遊せず、正のcDEPにより電極の縁に引き付けられてしまった。

印加周波数が 50kHz で、印加電圧が 0.5V p-p である場合には、図4Bに示すように、DS19の浮遊が起こった。この限界を超えると細胞は浮遊し、電圧の上昇につれて富裕の高さがより高くなった。この行動は、cDEP理論とも、またelectrorotationおよび細胞密度ならびに細胞の保持培地を用いて測定した細胞の誘電特性とも整合した。

(2) FFF/cDEPの併用

上記で説明した装置を用い、室に流体の流れを走らせ、電極に印加された電圧

シグナルの周波数を関数として、導電率約 $10\text{mS}/\text{m}$ のスクロース 8.5% とデキストロース 0.3% の溶液中に保持されたHL-60前骨髄白血病細胞の速度を対象とする第二の実験を行った。電圧シグナルを印加しない場合、流体の流量 $10\text{ml}/\text{min.}$ の影響により細胞が輸送されるが、この時の速度は1秒当たり 20ミクロン 以上であった。流体の流れは細胞を含有する溶液、別の流体、あるいは細胞を含有しない同一の流体の何れでも良い、さらに、溶液が径時変化するように、例えばpHや溶液の導電率が変わってゆくようにアレンジすることも出来る。

図5Aに示すように、電極に電圧シグナルを与えると、細胞が室の底部壁面上を移動する高さに影響が出、細胞の薄層流れ中の位置と速度が変わった。 10kHz 以下では、印加電圧 3Vp-p の場合、細胞の速度は1秒当たり約 50ミクロン に上昇した。周波数を約 10kHz から 25kHz までの範囲に増加させると、細胞に速度は徐々に低下し、浮遊の高さも低くなった。 30kHz 以上では、細胞は電極に引き

付けられて、移動を止めてしまった。周波数の増加に対するこの反応は細胞の電気特性の測定値から推定される行動と一致していた。

図5Bおよび5Cに示すように、異なる細胞特性を持つ別の細胞を用いた実験からも同様の結果を得た。特に、図5Bは導電率 $10\text{mS}/\text{m}$ のスクロース8.5%とデキストロース0.3%の溶液中に保持されたMDA468細胞 (Janet Priceより惠贈) を流量 $40\text{ml}/\text{min.}$ および 3Vp-p で実験した結果を示している。図5Cは同一の溶液中に保持されたMDA435細胞 (Janet Priceより惠贈) を流量 $40\text{ml}/\text{min.}$ および 3Vp-p で実験した結果を示している。図5Dは同一の溶液中に保持されたMDA435細胞 (Janet Priceより惠贈) を流量 $40\text{ml}/\text{min.}$ および周波数 31.6kHz で実験した結果を示している。図5Dで示すように、細胞の速度は電圧と共にほとんど直線的に上昇する。

(3) HL-60とヒト血液細胞の混合物に対するcDEP/FFF

装置の室には予め、混合比1:3、最終濃度 5×10^7 細胞/ ml のHL-60とヒ

ト血液細胞との混合物を負荷しておいた。細胞は、導電率 $10\text{mS}/\text{min.}$ のスクロース8.5%+デキストロース0.3%の溶液中に保持した。40kHzで 3Vp-p の電圧を電極に印加したところ、流量 $10\text{ml}/\text{min.}$ で流体の流れが開始した。HL-60細胞はすべて電極素子の縁で去れる一方、ヒト血液細胞(主として赤血球)は浮揚して流体に依って輸送された。周波数を $8 \sim 15\text{kHz}$ の範囲に調整すると、HL-60細胞が再び放出され、その輸送速度は赤血球と相対して制御されていた。HL-60は赤血球の上下を浮遊するとき、その電界中の位置に依存しながら、赤血球と対応して赤血球よりも早く、あるいは遅く移動した。

次は本発明にしたがって行ったさらに他の実験である。流体を注入して、室の末端各々のスロットから除去した。出口には室から排出される細胞を捕捉するウェルを設けた。実験実施前に5分間室を20%ウシ血清タンパク溶液で浸して、なるべく細胞がガラス表面に付着しないようにした。このかわりに、室に空気を吹き込んだり、あるいはシランで洗浄処理しても良い。電極を一つおきに固定あるいはスイープ周波数の正弦波電圧に接続して、誘電電気泳動力を発生させて、オシロスコープを用いてモニターした。薄層で流れる溶出緩衝液の力で分離

室から細胞を除去し、これを室の入口と出口の間にあるプッシュプル構成物に接続してあるデジタルシリンジポンプで制御した。流体の流路は常にバブルフリーとした。

細胞混合物約30ml（約 1.2×10^6 細胞）を注入して室の半分を満たした後、5V p-pの200kHzを30秒間電極に印加して、正のDEPによって細胞を電極先端の高電界領域に集めた。しかしながら、室の半分だけを満たす必要はなく、室を大きくすれば識別を向上させることが出来る。そうすると、流量5ml/min.で溶出液（導電率10mS/min.のスクロース8.5%+デキストロース0.3%混合物でもある、細胞を含まない懸濁緩衝液からなる）が流れ始めた。室の入口と出口の間にあるプッシュプル構成物に接続してあるデジタル

シリンジポンプで制御することによりこの流れを実現することも出来る。流れの制御は蠕動ポンプ、重力、血圧などによっても行うことが出来る。腫瘍細胞が選択的に保持されるまで、印加電気シグナルの周波数を下げ、血液細胞は溶出させて最終ウェルで捕捉した。20分後まだ電極に残っている腫瘍細胞に影響を与えることなく、2個の追加シリンジポンプをクロス流（cross-flow）させて、ウェルから細胞を除去した。電圧を切ってDEPにより捕まっていた細胞を放出させ、溶出して、別個に回収した。

本発明の装置のさらに他の実施態様において、ガラススライド（例えば、1"x3"）二枚を室壁面として用い、本発明の装置を制作した。これらの壁面の間にテフロンスペーサーを置いて約50ミクロンの間隔を空けた。この装置はガラススライドが側壁をなし、スペーサーが頂部と底部の壁面をなすようになっている。この代わりに、ガラススライドが頂部と底部の壁面をなしてもよい。この典型実施態様においては、頂部と底部の壁面には相互に約20ミクロンの間隔を置く、幅約20ミクロンの平行電極素子からなる微小電極列を担持させた。スペーサーが側壁をなしても良い。一壁面の電極素子が他の電極素子間の空間と一直線に合うように配置しても良い。さらに、電極を室壁面のうち長い壁面に沿って配置し、電極が流体の流れに実質的に平行に並ぶようにしても良い。また、電極列の長さ、幅、厚さ、および間隔を変えることにより、強度が異なり、非均質度が異なる電界

を形成し、位相の変化の関数として、空間を移動する。しかしながら、電極列は平行でなくても良く、直列、リニア、多項式、交互配置、三次元などの幾何学的構成も利用することが出来る。

典型的な実施態様において、電極素子を一つおきに、室壁面の短末端に沿っている電極バス (electrode bus) に接続している。室壁面の一つ上の電極バスは0および180の相対的な位相 (relative phase) を持つ電気シグナルを受け取り、他の室壁面のバスは90および270の相対位相を持つ電気シグナルを受け

取る。また、電極は一つおきに異なる値を持つ相対位相を持つ電気シグナルをうけとる。電極バスは電気シグナル発生器に接続するが、このシグナル発生器は、例えばデジタルシンセサイザーであっても良い。他の好適シグナル発生器としては、例えば、オシレーター、関数発生器、パルス発生器、デジタルアウトプットカード、RF源、レーザーなどが挙げられる。本章で説明している典型実施態様の電極列はクロムの10nmのシード層に積層した100nmの金である。

本発明で使用するシグナルは約0から15Vまでで、且つ約0.1kHzから約180MHzまで、よりこのましくは約10kHzから約10MHzまでである。下記の実験では、注文生産のデコタリシンセサイザーでシグナルを発生させている。本発明で使用する流体の流れは、約0.1ml/min.から約5001ml/min.まで、より好ましくは約1ml/min.から約501ml/min.までである。下記の実験では約1-100ml/min. の流体の流れをデジタルシリンジポンプで発生させている。

(4) cDEP力による細胞の浮遊

導電率10mS/mのスクロース8.5%+デキストロース0.3%の溶液中に保持されたDS-19ネズミ赤白血病細胞 (Rifkind) の浮遊を、流体の流れの不存在下および流体の流れの存在下、電極に印加したシグナルの周波数を関数として検討した。導電率が約10mS/mから約2S/mまでの範囲である、組織培養基などの各種溶液も使用できることを理解すべきである。さらに、細胞のみの集団も利用可能である。溶液の導電率が細胞内部よりも遥かに高い、あるいは遥かに低い何れかの場合、これらの溶液は実施可能である。

DS19細胞を懸濁培地と混合して、流量10ml/minで室に投入した。電

気シグナルの周波数を、ピークからピークではかって3ボルトで、徐々に約1 kHzから15 kHzまで上昇させたところ、三つの反応速度論上の効果が認められた。

(i) 1～30 kHz

細胞はcDEP力によって電極上を浮遊し(典型的に、周波数次第で約18 mm)、twDEPが印加した進行波と反対方向に移動した。この時の速度は周波数の増加にあわせて40ミクロン/秒まで上昇した。速度の早い細胞は遅いものを追い越したが、cDEP単独使用で細胞操作した場合に通常は見られる真珠の鎖は認められなかった。流量10 ml/minでtwDEP力に対して直角に形成された流体の流れの存在下では、細胞各々はその電気特性によって異なる角度逸れ行った。さらに、流体の流れによる細胞の速度は、cDEP/FFF原理通りに電極の面からの距離に依存していた。

(ii) 30～50 kHz

細胞に働くcDEP力は極めて小さく、細胞は室底部の電極の近傍に止まっていた。細胞の一部はtwDEPの進行波と同じ方向に逸れて行き、他はほとんど逸れず、さらに他の細胞はtwDEP波と反対方向に逸れて行った。流量10 ml/minの流体の流れの存在下、流体の流れ中の最大の速度差はcDEP/FFFの影響に起因して起こった。twDEP力では異なる細胞それぞれについて、流体の流れを挟んで異なる程度の逸れが起こったに過ぎなかった。

(iii) 50 kHz～15 MHz

細胞はほとんど電極の縁に引き寄せられ強い正のcDEPの影響により固定されていた。

これらの所見は誘電電気泳動一般理論で予想していたものと一致した。さらに、cDEPとtwDEPの影響を組み合わせ、細胞の電気分極の実因子と虚因子ならびに懸濁培地の誘電および導電特性による新型の細胞分類が可能であることを示している。

例えば、本発明の方法を用いて、未知の微粒子物質の物性を決定することが出きる。未知の生物または有機またはミネラルサンプルを含有するサンプルを質に

投入して上記した方法により分離する。無関係の粒子を分離除去の後、未知の粒

子を出口に集める。この粒子を、診断学、微生物学、組織学、で用いられているもの、例えば電子顕微鏡など、当業者に知られている標準粒子特性決定法により分析する。粒子のユニークな特性を決定した後、研究者はこれらの特性と既知の粒子特性とを比較して、未知の粒子が既知のものと同じなのか、あるいは類似特性なのかを決定する。

さらに、本発明は、既知の粒子の特性決定もその範囲に含む。既知の粒子の特性を知ることにより、似たようなトラッピング周波数、電圧、流速、その他の上記の変数に基づいて、未知の粒子を特定するための参照用に使うことができる。本発明の室の中にサンプルを導入し、上記の分離法を適用することができる。このような分離法を実施することにより、その粒子のトラッピング周波数と、解放周波数を決定することができる。これらの値は、次いで、この既知のサンプルに未知のサンプルの同様な変数を対比させるのに役立つ。ある既知の粒子を未知の粒子から分離すること必要とする特定の治療分野においては、分離法を完了するためにそのような値が必要となる。

本発明の医療上の応用には、未知のサンプルが種々の細胞を含んでいるか否かについてスクリーニングするのに用いる診断の道具として本発明の装置と方法を使用することがある。まず、上記のように、患者のサンプルを本装置に入れ、予め決定しておいたパラメータと特性に基づいて種々の細胞を分離することができる。これらの細胞には、ガン細胞、細菌に感染した細胞、ウイルス、原生動物が含まれ、特定の酵素又は細胞小器官を欠く細胞、変性された生検材料、プラーク、パップスミアを含む掻き取りテスト等が含まれる。したがって、大きさ、密度、誘電強度、導電性などに基づいて流体の流れにおいて異なる沈殿速度を有するあらゆるタイプの粒子を分離することが本発明の範囲にはいる。本発明は、ガンやその他の細胞疾患などの存在を診断するのに利用することができる。

他の医療応用例としては、本発明の装置と方法を用いてガン細胞といった望

ましくない細胞を望ましいか又は通常の細胞を含む細胞群から分離することがあ

る。例えば、骨髓にガンが検出されたとき、本発明による装置に患者の骨髓細胞を入れて、ガン細胞または新生物発生前の細胞などを正常な細胞から分離できる。この正常な細胞は、室の出口で集められて、患者に戻され、望ましくない細胞は室の出口からのちに集められて、特性を調べられ、今後の研究に利用され、または単に廃棄されることとなる。このようにして、望ましくない細胞を正常細胞群から取り除き、同時に腫瘍細胞、正常細胞、先祖細胞などの特定の細胞の濃度を上げることができる。

ここに開示し、クレームした装置と方法は、ここでの開示内容に基づき不当な実験を行うことなしに製造し、実施できるものである。本発明の装置と方法は、好適な実施例により説明してきたが、当業者にとっては、本発明の概念と、精神、範囲から逸脱することなしに、装置、方法、工程、各工程の順番に変更を加えることができる。当業者にとって明らかな全ての置換と変更は、添付のクレームにより規定された本発明の精神と、範囲と、概念に含まれるべきものである。

参考文献

次の参考文献は、例示的な手順又はその他の詳細な補充事項を開示する範囲において、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

1. Arnold, W.M. et al. (1982) *Naturwissenschaften*, 69, 297-300.
2. Becker et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 860-864.
3. Becker, F.F. et al. (1994) *J. Phys. D: Appl. Phys.* 27(12), 2659-2662.
4. Boyum, A. (1974) *Tissue Antigens* 4, 269-274.
5. Cantrell, D.A. et al. (1992) *Ciba Found Symp.* 164, 208-222.
6. Chess, L. et al. (1976) in: *In vitro Methods in Cell Mediated and Tumor Immunity*, 255-261.
7. Fischer, A. (1993) *Brit. J. Haematol.* 83, 531-534.
8. Fuhr, G. (1985) *Über die rotation dielektrischer körper in rotierenden feldern*, PhD. Dissertation, Humboldt-Universität, Berlin, Chap. 3, 24-53.
9. Gascoyne, P.R.C. et al. (1994) *IEEE. Trans. Ind. Appl.* 30, 829-834.

10. Gascoyne, P.R.C., et al. (1992) Meas. Sci. Technol. 3, 439-445.
11. Giddings, J.C., (1993) Science 260, 1456-1465.
12. Hagedorn, R. et al. (1992) Electrophoresis 13, 49-54.
13. Holzel, R. et al. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1101, 195-200.
14. Huang, Y. et al. (1992) Phys. Med. Biol. 37, 1499-1517.
15. Huang, Y. et al. (1993) Phys. Med. Biol. 37, 1499-1517.
16. Markx, G.H. et al. (1994) Microbiology 140, 585-591.
17. Smeland, E.B. et al. (1992) Leukemia, 6, 845-852.
18. Smeland et al., (1992) Leukemia, 6: 845-852.
19. Stout, R.D. (1993) Curr. Opin. Immunol. 5(3), 398-403.
20. Wang, X.-B. et al. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1193, 330-344.
21. Wang, X.-B. et al. (1993) J. Phys. D: Appl. Phys. 26, 1278-1285.

【図1】

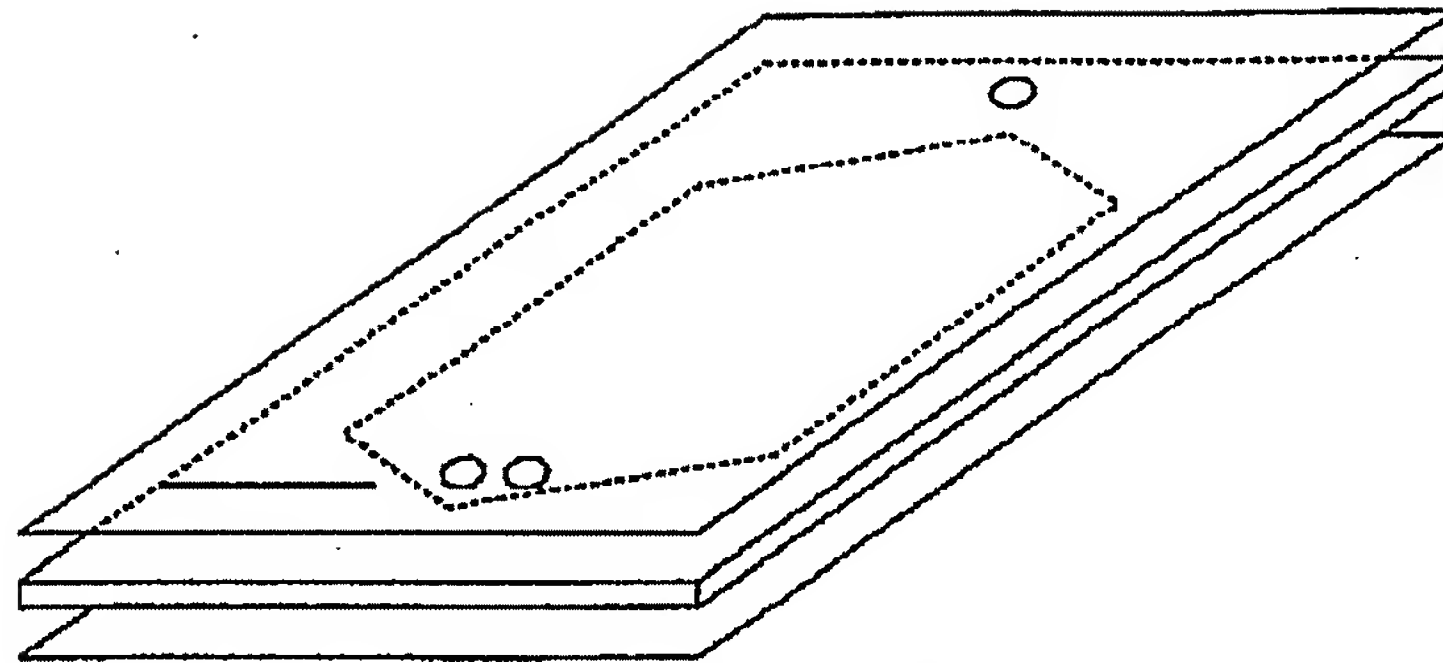


FIG. 1A

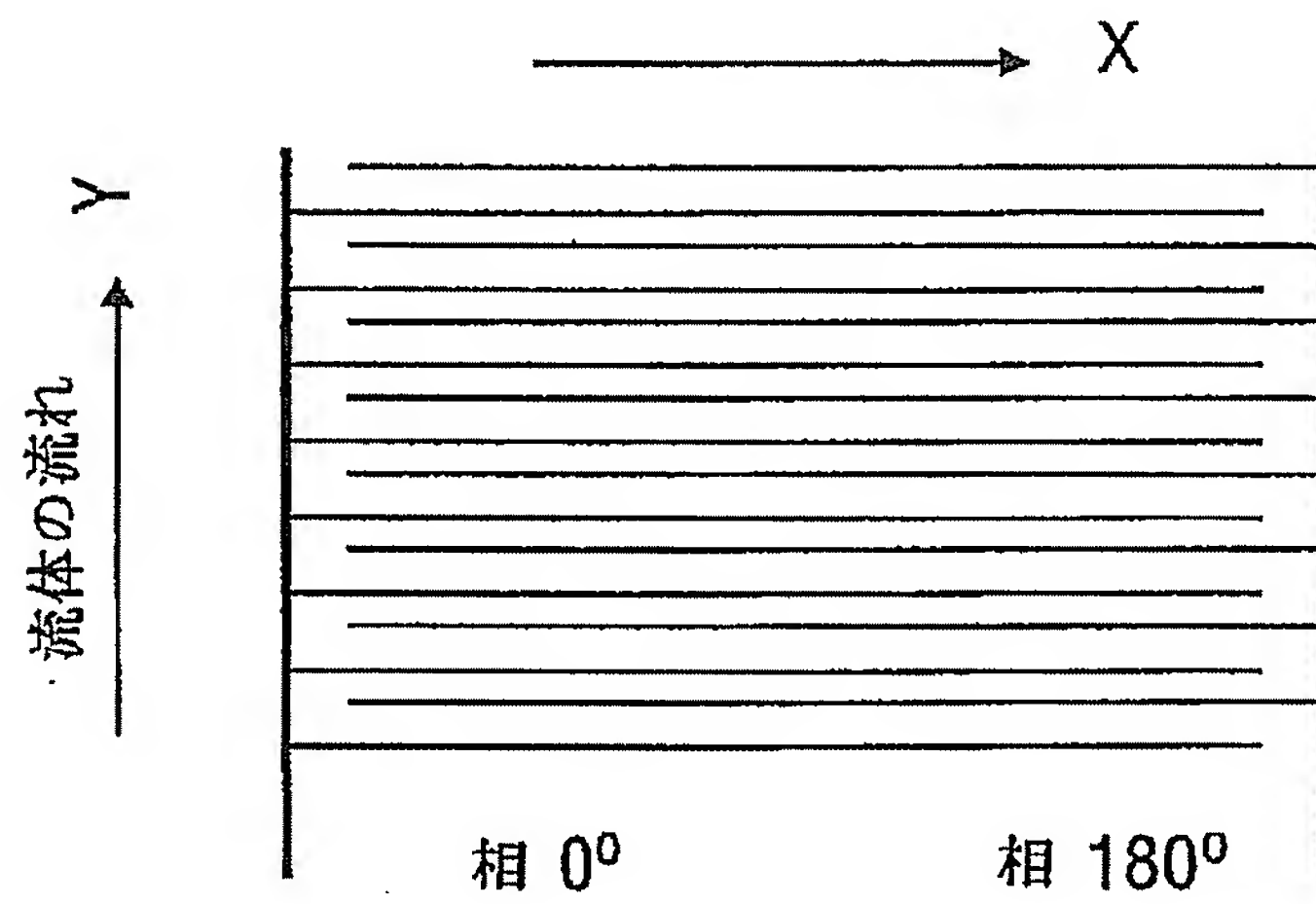


FIG. 1B

【図1】

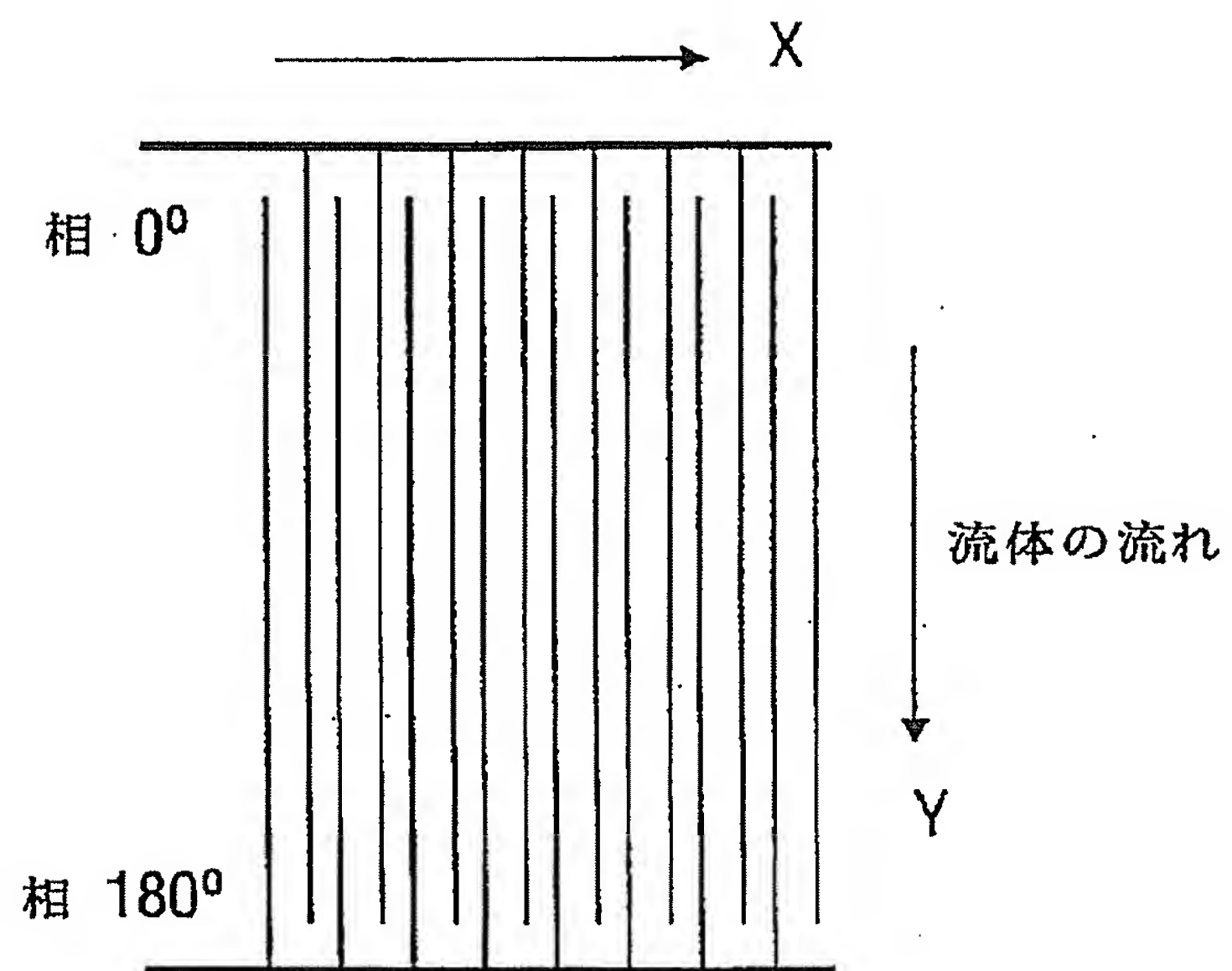
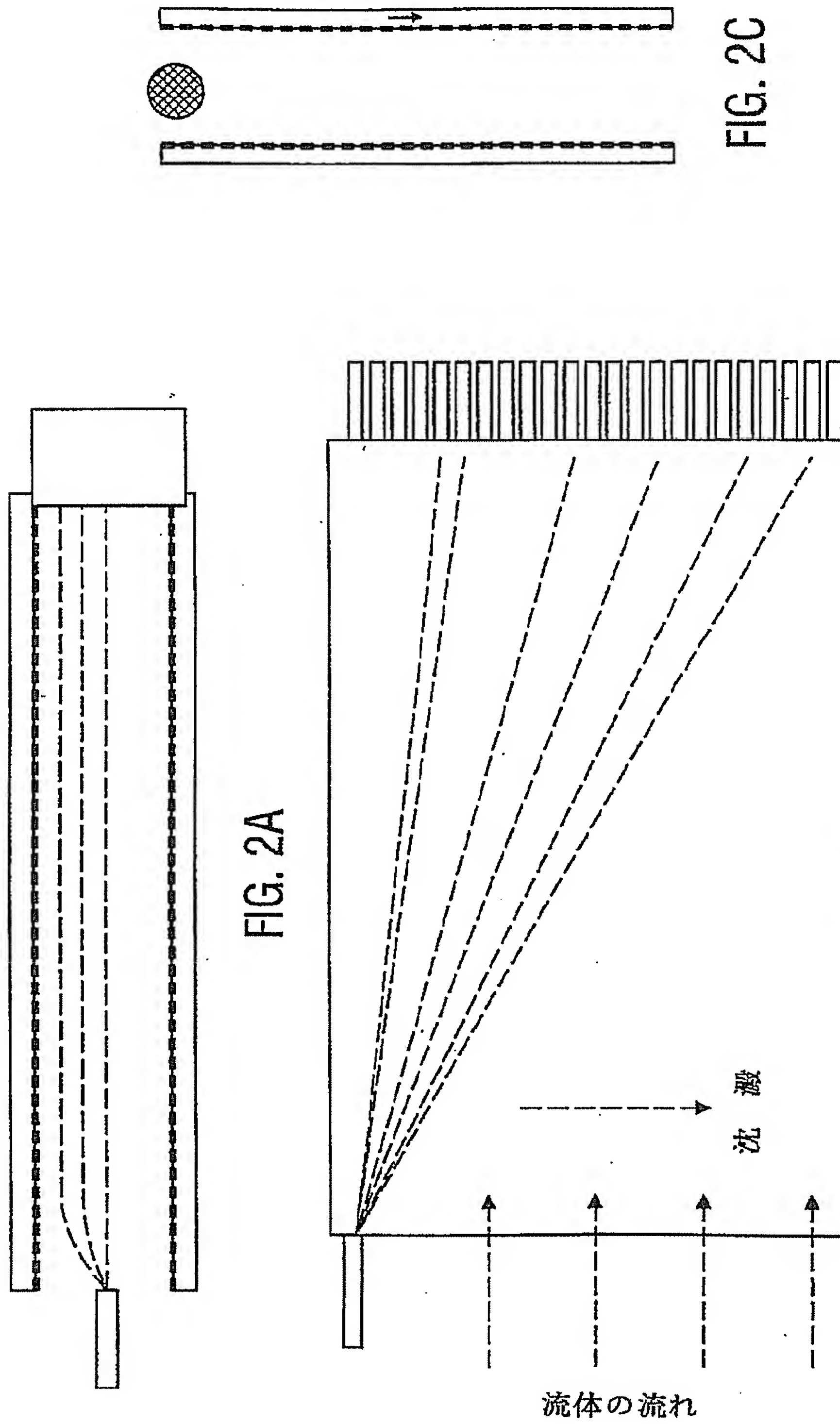
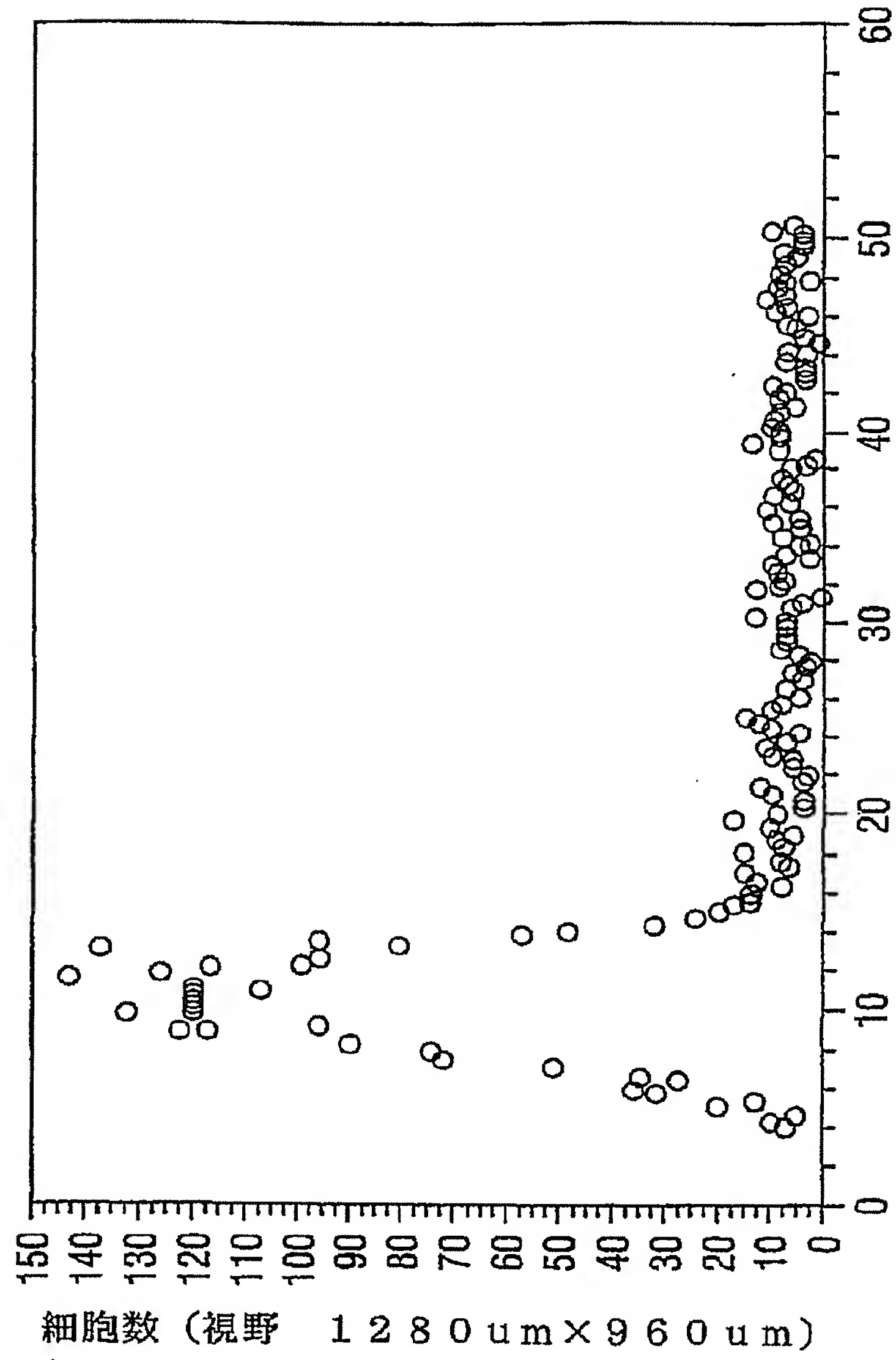


FIG. 1C

【図2】



【図3】



時間 (分)

FIG. 3A

【図3】

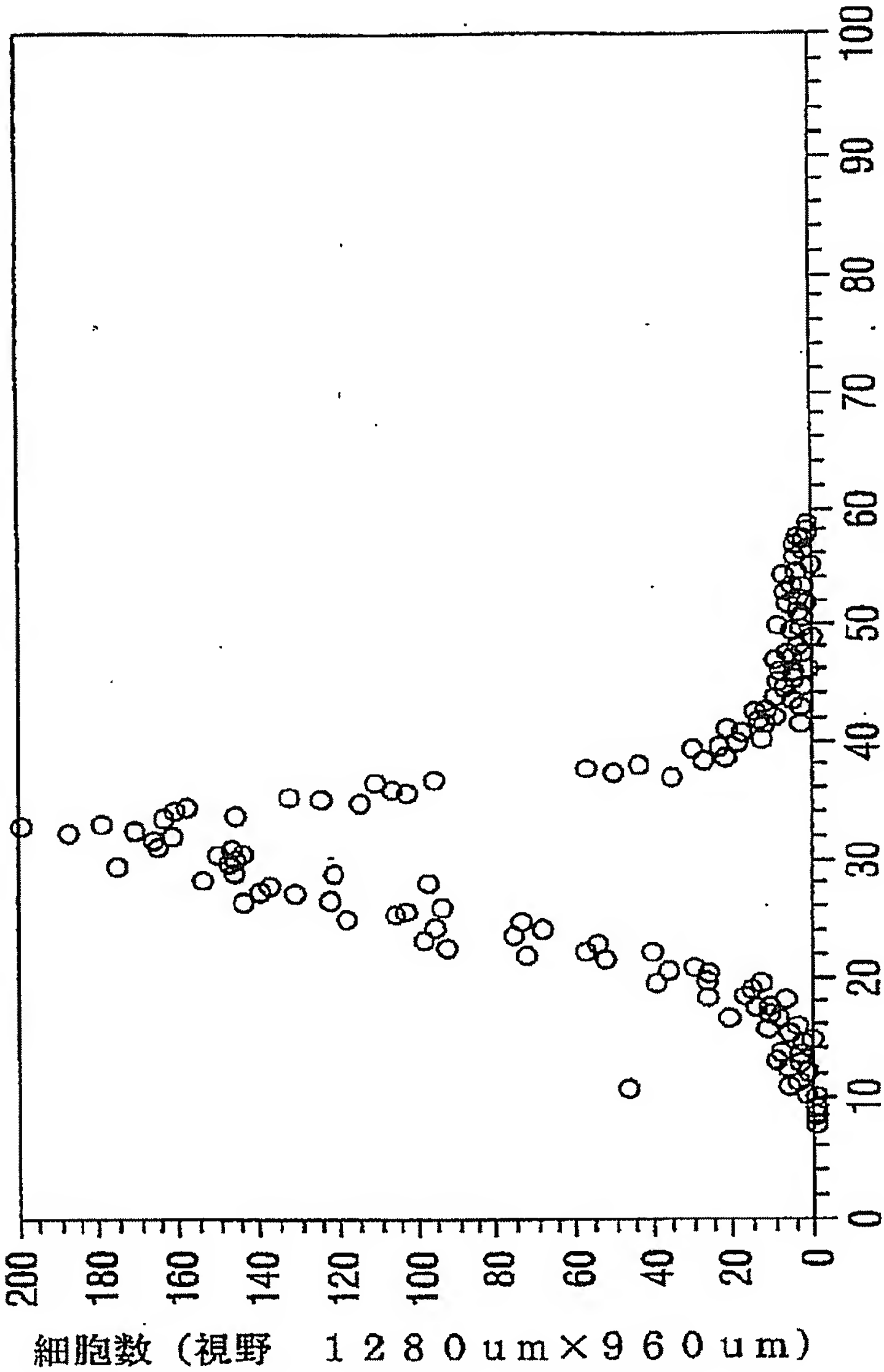
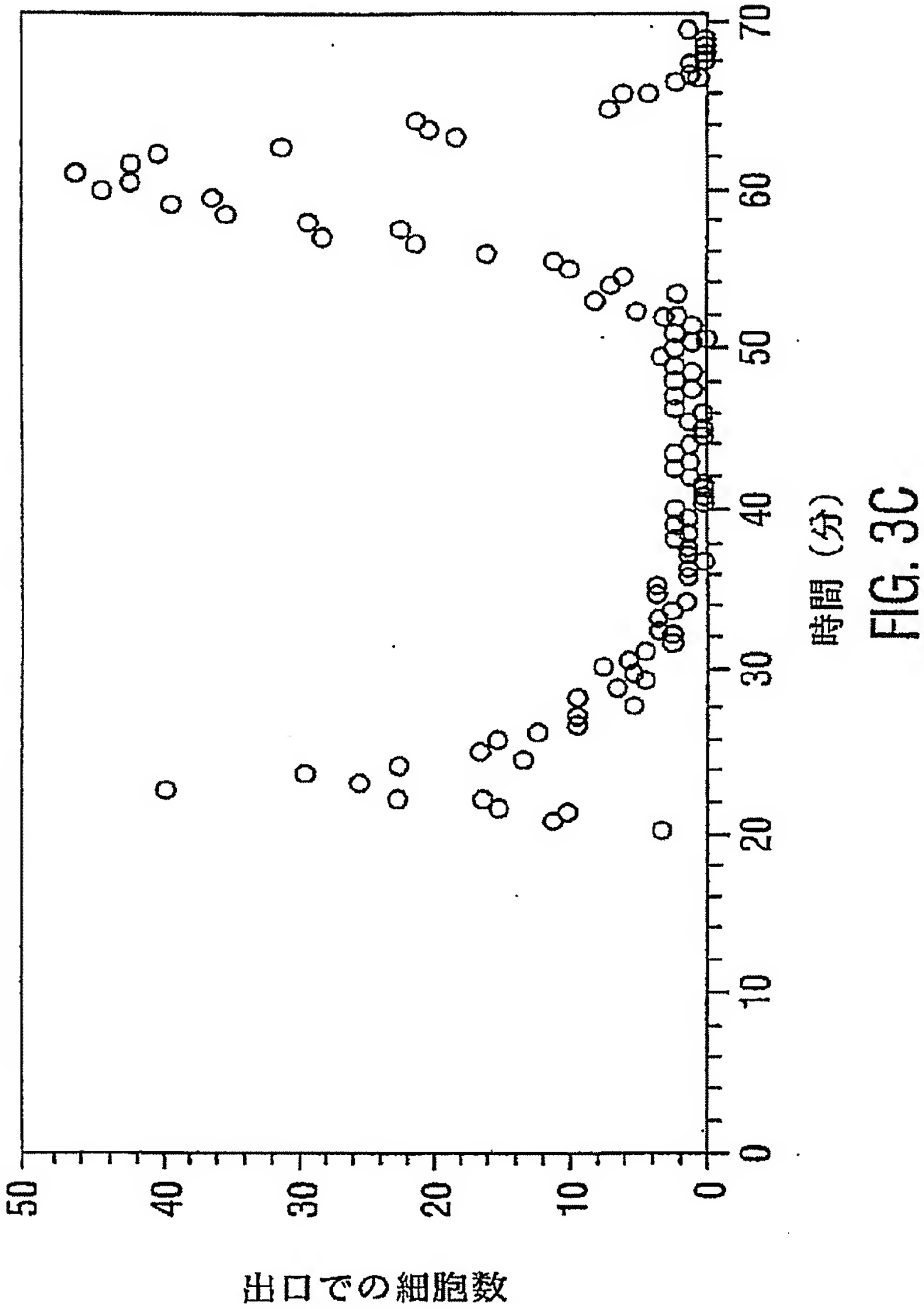


FIG. 3B

【図3】



【図 4】

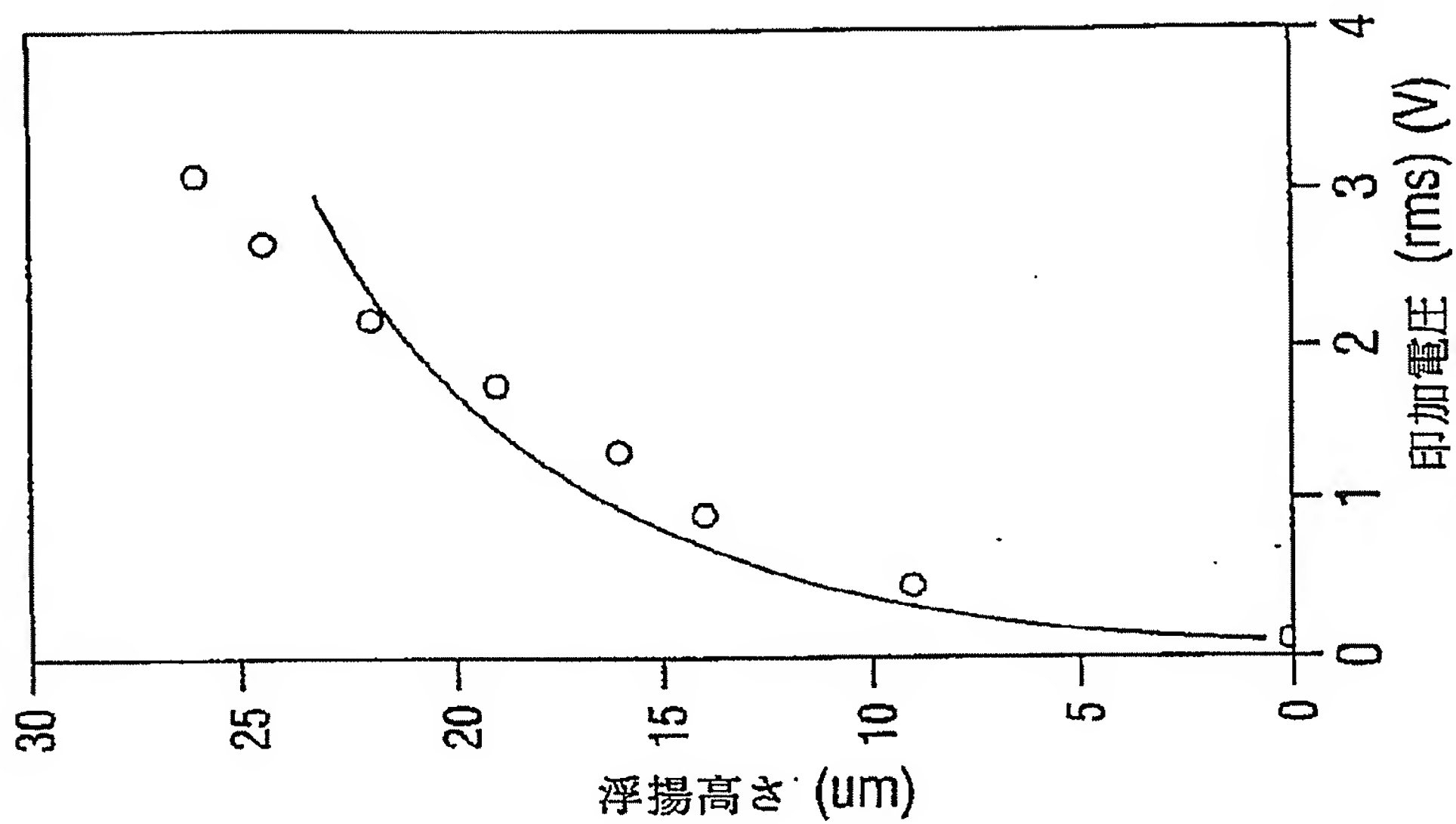


FIG. 4B

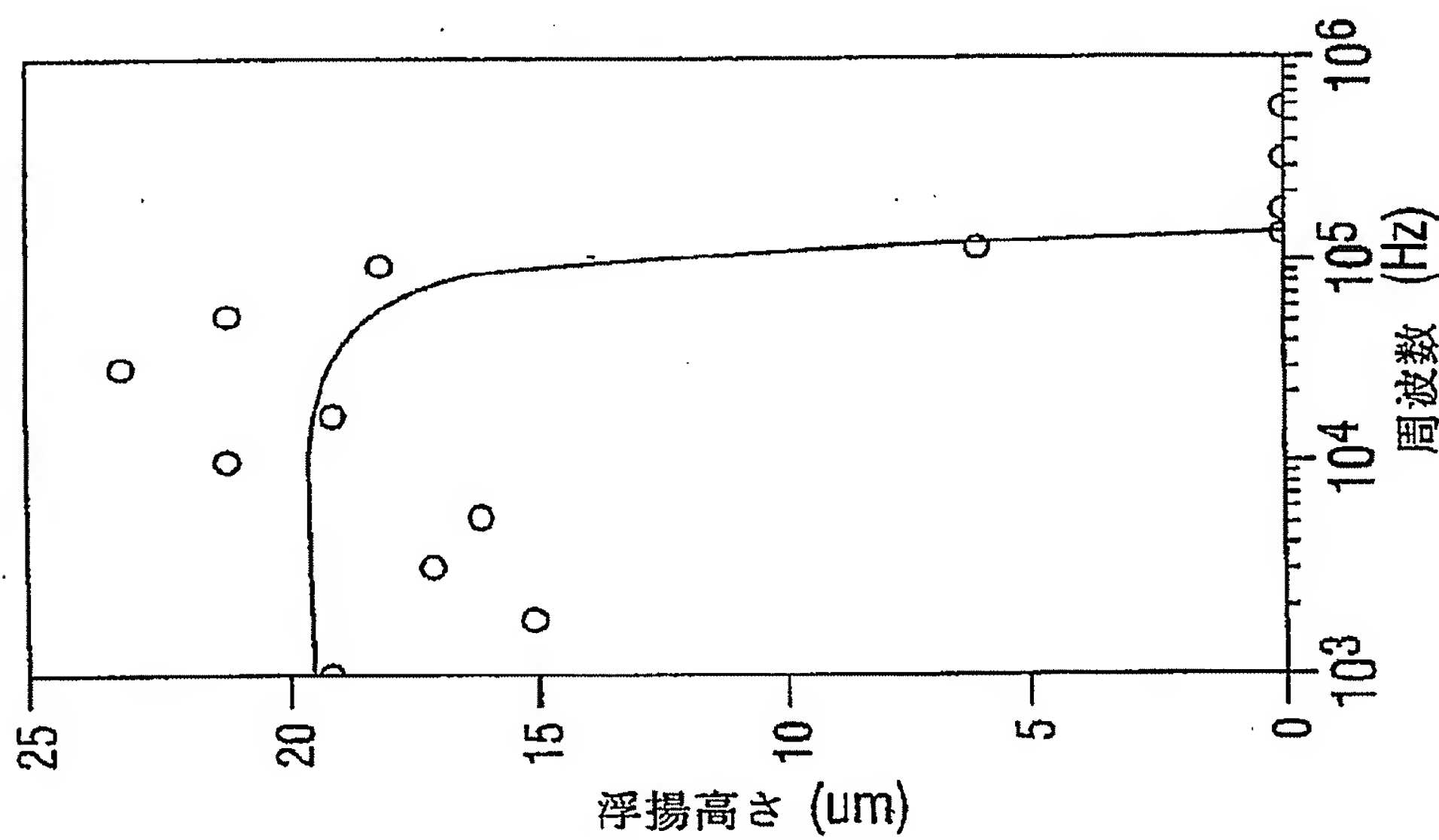
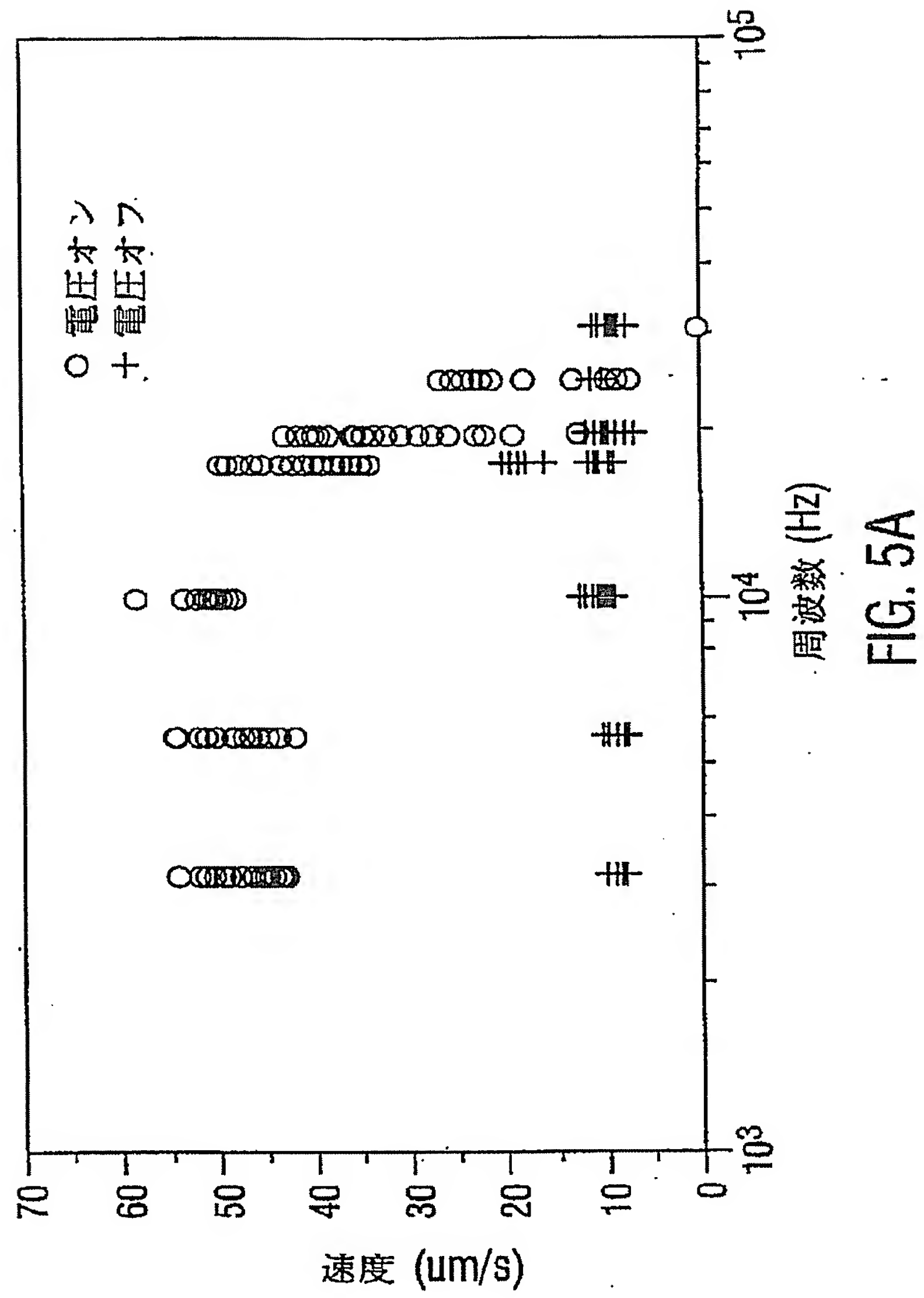


FIG. 4A

【図5】



【図5】

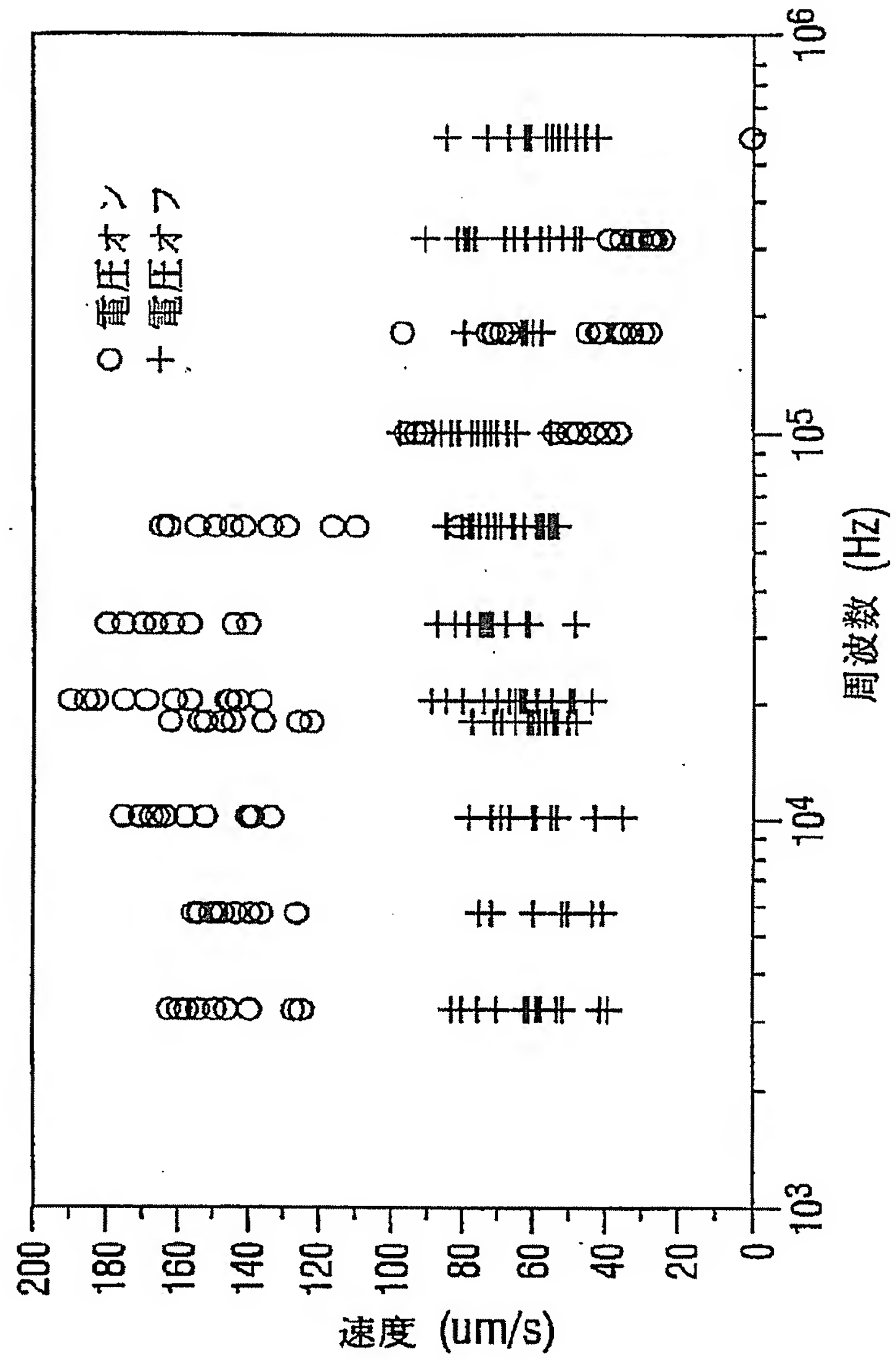
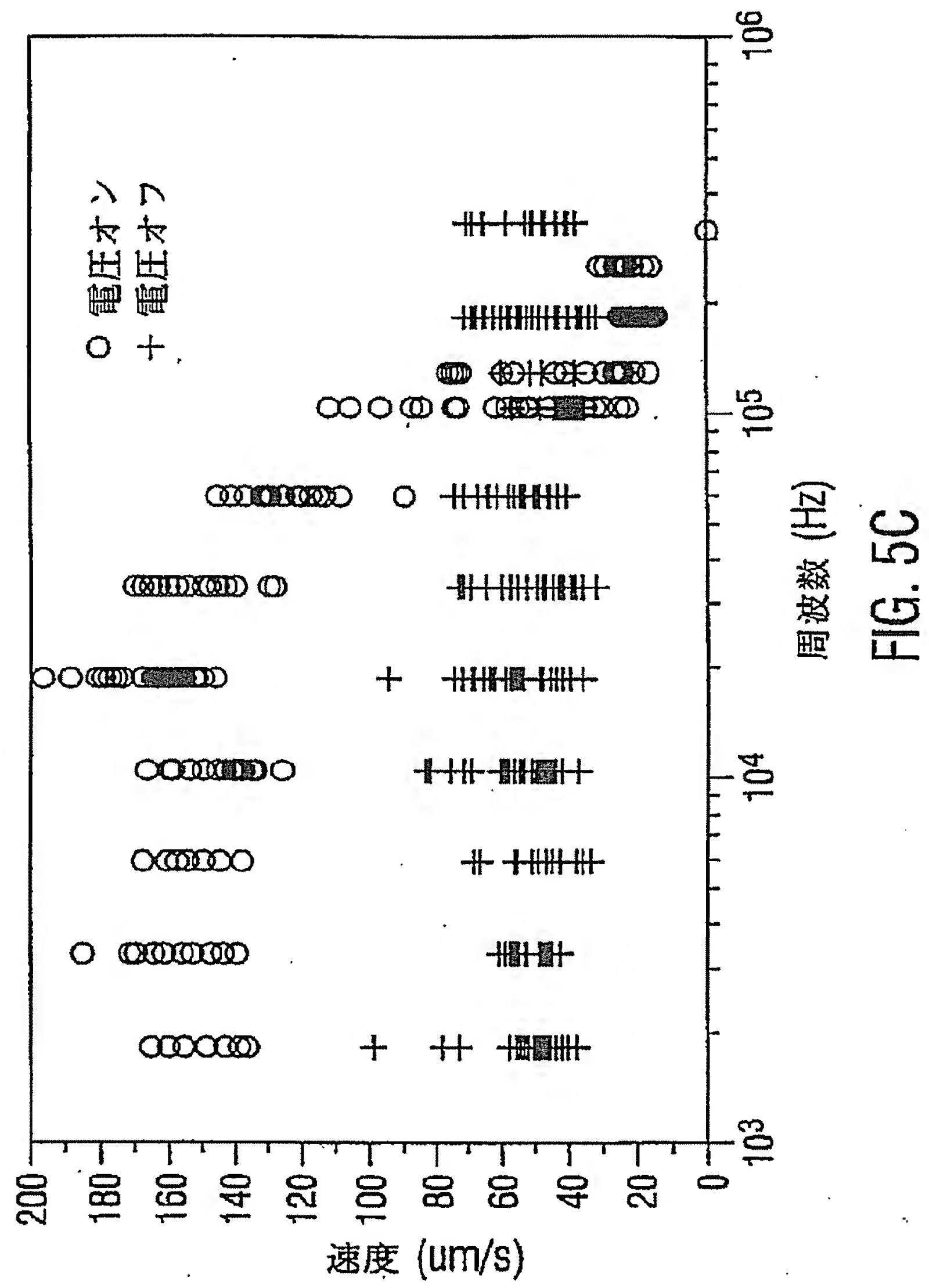
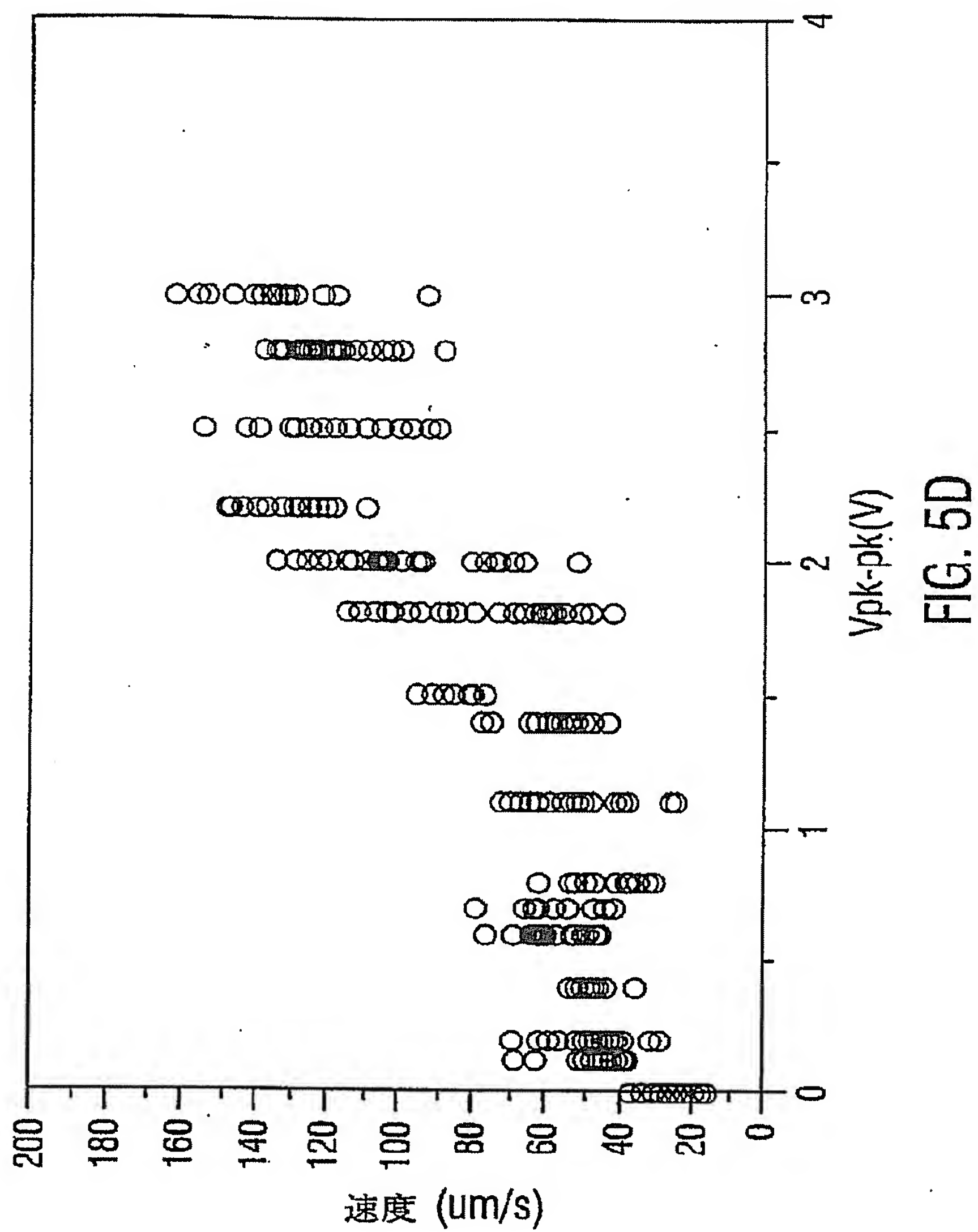


FIG. 5B

【図5】




【図5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US97/01746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : B01D 57/02; B03C 5/00; C12Q 1/24; G01N 27/447 US CL : 204/547, 643 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 204/547, 643 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS CAS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4,326,934 A (POHL) 27 APRIL 1982 (27/04/82) SEE ENTIRE DOCUMENT, ESPECIALLY FIGS. 1-3.	11-13, 23, & 72-74
X	GB 2,266,153 A (BETTS ET AL) 20 OCTOBER 1993 (20/10/93) SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-10, 14-22, 24-26, 29-58
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date. "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 MAY 1997		Date of mailing of the international search report 09 JUL 1997
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer  KATHRYN GORGOS Telephone No. 703-308-3328

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US97/01746

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SU 474,723 A (AS USSR BIOLOGPHYS) 29 JUNE 1975 (29/09/75) SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-10, 14-22, 24-35, 37, 39-43, 47-56, 58-62, 64, 65, 70, 71
P	US 5,489,506 A (CRANE) 06 FEBRUARY 1996 (06/02/96) SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-10, 14-55, 57, 58
A	US 4,001,102 A (BATHA ET AL) 04 JANUARY 1977 (04/01/77).	NONE
A	US 5,344,535 A (BETTS ET AL) 06 SEPTEMBER 1994 (06/09/94).	NONE
A	US 5,454,472 A (BENECKE ET AL) 03 OCTOBER 1995 03/10/95.	NONE
A	US 4,440,638 A (JUDY ET AL) 03 APRIL 1984 (03/04/84).	NONE
A	DAVIS ET AL. FEASIBILITY STUDY OF DIELECTRICAL FIELD-FLOW FRACTIONATION. SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY VOL. 21 NO. 9 PAGES 969-989.	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
		G O 1 N 27/26	3 0 1 A 3 0 1 Z
(31)優先権主張番号	0 8 / 6 0 5, 5 3 5		
(32)優先日	平成8年2月23日(1996. 2. 23)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US		
(72)発明者	ファン, イン アメリカ合衆国、77054 テキサス、ヒューストン、ケンブリッジ 7900、#29—1 エイ		
(72)発明者	ワン, シャオーボ アメリカ合衆国、77054 テキサス、ヒューストン、ケンブリッジ 7900、#29—1 エイ		